

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE NO ESTADO DE MINAS GERAIS

AUTORA: VALDINÉIA APARECIDA DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: PROF. Dr. ROGÉLIO LOPES BRANDÃO

CO-ORIENTADORES: PROF. Dr. LUCIANO GOMES FIETTO

PROF. Dr. MAURÍCIO XAVIER COUTRIM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

OURO PRETO

2005

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, sob a orientação do Professor Dr. Rogélio Lopes Brandão e com auxílio financeiro da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

**“Existe ouro e pérola, mas a coisa mais
preciosa são os lábios instruídos”
“Com a sabedoria se constrói a casa, e
com a prudência ela se firma. Pelo
conhecimento, os quartos ficam cheios
de bens preciosos e agradáveis.”**

(Provérbios 20,15; 24,3)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Antônio e Eva, a meus irmãos e
a Artur o meu querido noivo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor incondicional e pelas tantas graças a mim concebidas durante esta fase tão importante de minha vida.

Ao meu orientador professor Dr. Rogelio Lopes Brandão pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por seu entusiasmo, dedicação e profissionalismo.

Ao Dr. Luciano Gomes Fietto, pelo socorro nos momentos mais oportunos, por sua paciência, incentivo e disponibilidade. Levarei comigo seu exemplo de amor pela ciência e de dedicação ao trabalho.

Ao Dr. Maurício Xavier Coutrim, pela amizade e apoio, pela disponibilidade, pelo auxílio em todos os momentos e por ser uma pessoa tão acolhedora e carismática.

Ao Dr. Ieso de Miranda Castro pela disponibilidade e pelo exemplo de dedicação nas longas horas de trabalho.

A Dra. Juliana Gomes Fietto pela convivência harmoniosa, pelos esclarecimentos e pelo apoio.

A Zezé por sua disposição em ajudar, por seu estímulo e por sua alegria contagiante.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Anamaria, Lisvane, Maristela, Irisa, André, Alexandre, Lucas, Matheus, Fernanda, Tótola, Pilar, Milene, Murilo, Luizáurea, Daniela, Juliana, Patrick, Thiago, Marcela, Ramon e Senhor Braz. Obrigada pela convivência saudável e pelos momentos de alegria que tornaram as horas de trabalho muito divertidas.

Aos colegas de mestrado, Ana, Lis, Jáila, Silvania, Kátia, Marcelo, Jorgino, Graça, Ângelo, Ellen, Marcus, Juciane, Dani, Dudu, Regina, Eduardo e Jaqueline pelo companheirismo e apoio durante todos os momentos desta caminhada.

A grande secretária Cida pela eficiência, disponibilidade de ajuda e por sua constante alegria.

Aos professores e funcionários do NUPEB pela ajuda e pelos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação.

Aos professores do Departamento de Química, pelo apoio, atenção e pela grande ajuda que muito contribuiu para a realização deste projeto.

Aos amigos que fiz durante esta jornada, em especial Ana, Lis e Irisa pela acolhida, compreensão, companheirismo e pela palavra amiga que em muitos momentos me confortou.

Aos amigos de Ouro Preto, de Repúblicas como a Jóia Rara e ao GOU pela convivência tão enriquecedora e pela contribuição na realização deste sonho.

A minha família pelo apoio, confiança e por acreditar que seria possível vencer todos os desafios e chegar ao final com a certeza da vitória.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Artur José Teixeira de Castro, meu futuro esposo, pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos. Você foi muito importante na concretização deste projeto, me ajudando sempre que possível e tornando o fardo bem mais leve, pois a seu lado tudo se torna mais simples e agradável.

A Maristela de Araújo Vicente, você foi uma irmã especial e uma guerreira que desbravou os caminhos para que eu pudesse trilhá-los em paz. Meus sinceros agradecimentos por tudo, jamais me esquecerei de sua garra e coragem.

A meus pais Antônio e Eva e meus irmãos Valdete, Rogério e Ronaldo, o apoio de vocês foi fundamental durante esta jornada. Muito obrigada pelo carinho, pela compreensão e por apesar da distância, estarem comigo em todos os momentos.

RESUMO

Cachaça é a mais popular bebida destilada produzida no Brasil. Em Minas Gerais a atividade se encontra em expansão, com uma produção anual de cerca de 230 milhões de litros, sendo uma grande atividade econômica com boas perspectivas para o mercado externo. Usualmente o processo de fermentação do caldo de cana é conduzido por uma sucessão de cepas de leveduras, sendo que a espécie de levedura predominante é a *Saccharomyces cerevisiae*. O aroma e o sabor são características que influenciam, identificam e oferecem qualidade às bebidas fermentadas. Na cachaça, e em outras bebidas como o vinho, tem sido incorporado o uso de cepas selecionadas no processo fermentativo para melhorar as características das bebidas e gerar um produto de melhor qualidade.

Neste trabalho, isolamos cepas de *S. cerevisiae* de diferentes regiões do estado de Minas Gerais, usando a nova metodologia (INPI-MG Protocolo-315) que seleciona leveduras com características desejáveis para a produção de cachaça. Assim, as cepas foram selecionadas seguindo critérios relevantes para a produção da bebida, como: não produção de H₂S, tolerância a etanol e a temperaturas elevadas, capacidade fermentativa, floculação e produção de micocinas. As leveduras foram também expostas a drogas como TFL e cerulenina para identificar aquelas maiores produtoras de álcoois superiores e ésteres. As cepas selecionadas foram identificadas como *S. cerevisiae* pela análise com enzimas de restrição da região ITS (*internal transcribed spacer region*). Nos últimos anos, várias metodologias baseadas na análise do polimorfismo do DNA têm sido utilizadas para permitir a discriminação entre cepas inoculadas de cepas remanescentes presentes na flora indígena envolvidas no processo fermentativo. Em nossos resultados demonstramos que o RAPD-PCR utilizando *primers* baseados no sítio de *splicing* de introns e PCR utilizando *primers* complementares a região do gene *COXI* não são suficientes para permitir uma boa diferenciação entre as cepas selecionadas, porém estas técnicas permitiram a distinção entre diferentes espécies de leveduras pertencentes ao grupo *Saccharomyces sensu stricto*. Por outro lado, o uso da cariotipagem para diferenciação das cepas com base no perfil cromossomal, permitiu uma nítida distinção entre todas as cepas analisadas. Apesar do

grande polimorfismo molecular encontrado não observamos correlação entre diversidade genética e localização geográfica. Posteriormente as cepas foram analisadas quanto a produção de álcoois superiores e ésteres através de cromatografia gasosa, demonstrando que as cepas produzem elevada quantidade de álcool isoamílico e caproato de etila. Os resultados demonstram que a metodologia utilizada é apropriada para a seleção de cepas com características adequadas para serem utilizadas na produção de cachaça de alambique. E que a utilização de cepas selecionadas como fermento iniciador requer o uso combinado de métodos bioquímicos e moleculares que possibilitem caracterizar e analisar a dinâmica das cepas selecionadas durante todo o processo fermentativo.

ABSTRACT

"Cachaça" is the most popular distilled beverage produced in Brazil. In Minas Gerais the activity is in expansion, with an annual production about 230 million liters, being a great economical activity with good perspectives to the external market. Usually the sugar-cane juice fermentation process has a succession of yeasts, with *Saccharomyces cerevisiae* being the predominant species. The aroma and flavor are characteristics that influence, identify and offer quality to the fermented beverage. In the "cachaça", and in other drinks as the wine, it has been incorporate the use of strains selected in the fermentative process to improve the characteristics of the beverage and to generate a product of better quality.

In this work, we isolated *S. cerevisiae* strains from different regions in the state of Minas Gerais, using the new methodology (INPI-MG Protocol-315) that selects yeasts with desirable characteristics for "cachaça" production. The strains were selected following important features such as: no H₂S production, ethanol and high temperatures tolerance, high fermentative capacity, flocculation and mycocin production (killer toxin). Furthermore the yeasts were exposed also to drug as TFL and cerulenin to identify those that overproduces high alcohols and esters. Selected strains were identified as *S. cerevisiae* by anintergenic transcribed spacer region (ITS) restriction analysis. In the last years, several methodologies of typing based on DNA polymorphism have been used to allow the discrimination among inoculated strains of present remaining strains of the indigenous flora involved in the fermentative process. Our results demonstrated that the RAPD-PCR using primers based on intron splicing sites and PCR using complementary primers to the flanking regions of the *COXI* gene are not sufficient to achieve good differentiation among selected strains; however these techniques allowed the distinction among different species of yeasts belonging to the group *Saccharomyces sensu stricto*. Nevertheless, the use of the karyotype analysis for differentiation of the strains with base in the chromosomal profile allowed a clear distinction among all of the analyzed strains. In spite of the high molecular polymorphism found we didn't observe correlation between genetic diversity and

geographical location. Subsequently the strains were analyzed for production of higher alcohols and esters by gas chromatograph assays, demonstrating that the strains produce high amount of isoamyl alcohol and caproic acid. The results suggest that the methodology used is proper for the selection of strains with appropriate characteristics for cachaça production. And that the use of the strains selected as ferment initiator requests the combined use of biochemical and molecular methods that make possible to characterize and to analyze the dynamics of the strains selected during the whole fermentative process.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Seleção de cepas da espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir de testes de assimilação de fonte de nitrogênio e carbono conforme descrito por Vaughan-Martini e Martini (1993) para a cachaçaria A.....	50
Tabela 2	Seleção de cepas da espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir de testes de assimilação de fonte de nitrogênio e carbono conforme descrito por Vaughan-Martini e Martini (1993) para a cachaçaria B.....	51
Tabela 3	Seleção de cepas da espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir de testes de assimilação de fonte de nitrogênio e carbono conforme descrito por Vaughan-Martini e Martini (1993) para a cachaçaria C.....	52
Tabela 4	Seleção de cepas da espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir de testes de assimilação de fonte de nitrogênio e carbono conforme descrito por Vaughan-Martini e Martini (1993) para a cachaçaria D.....	53
Tabela 5	Teste de resistência a TFL e cerulenina em cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
Tabela 6	Resultado do teste de floculação em YP 2% de glicose.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biossíntese de L-leucina e formação de álcool isoamílico e acetato de isoamila.....	13
Figura 2	Biossíntese de ácido graxo em leveduras.....	14
Figura 3	Atividade invertásica das 24 leveduras selecionadas.....	58
Figura 4	Gel de acrilamida corado com prata mostrando o fragmento de ITS, amplificado a partir dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4.....	62
Figura 5	Gel de acrilamida corado com prata apresentando o produto de digestão do fragmento de ITS com a enzima <i>CfoI</i>	63
Figura 6	Gel de acrilamida corado com prata apresentando o produto de digestão do fragmento de ITS com a enzima <i>HaeIII</i>	64
Figura 7	Gel de acrilamida corado com prata apresentando o produto de digestão do fragmento de ITS com a enzima <i>Hinfl</i>	65
Figura 8	RAPD-PCR, produto obtido após amplificação com os <i>primers</i> EI1 e LA1 de diferentes espécies <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. paradoxus</i> e <i>S. kluyveri</i>	67
Figura 9	Produto de PCR obtido após amplificação com os <i>primers</i> 3L, 3R, 4L e 5R de diferentes espécies <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. paradoxus</i> e <i>S. kluyveri</i>	79
Figura 10	Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, mostrando o perfil do cariótipo de diferentes espécies <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. paradoxus</i> e <i>S. kluyveri</i>	70
Figura 11	Determinação da curva de crescimento celular e consumo de sacarose.	72
Figura 12	Determinação da produção de etanol.....	74
Figura 13	Determinação de álcool isoamílico e ácido capróico.....	75
Figura 14	Análise do teor de Zn no e solo e caldo de cana e teor de álcool isoamílico nas amostras de cachaça de acordo com as destilarias que forneceram as amostras.....	116

LISTA DE ABREVIACOES

α-IPM	α -isopropilmalato sintase
AATse	Álcool acetiltransferase
Acetil CoA	Acetil Coenzima A
ATF	Gene que codifica a enzima álcool acetiltransferase
CoA	Coenzima A
COXI	Gene mitocondrial que codifica a subunidade 1 da citocromo oxidase
DNAmt	DNA mitocondrial
DNAr	DNA ribossomal
DO	Densidade ótica
EDTA	Etilenodiaminotetracético
FAS2	Gene responsável pela resistência a cerulenina
HPLC	“higher Performace Liquid Cromatografic”
ITS	Internal transcribed spacer region
MAAB	Ministério da Agricultura e Abastecimento
PCR	Polymerase chain reaction
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
SUC2	Gene que codifica para enzima invertase
TFL	5',5',5' -trifluoro-DL-leucina
TFSA	Terra fina seca ao ar
U.A.E	Unidade de atividade de enzima

ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIACÕES	XIII
INTRODUÇÃO.....	1
1 Introdução.....	2
1.1 Importância econômica da cachaça.....	2
1.2 A Cachaça de Alambique de Minas.....	4
1.3 Produção de cachaça de alambique.....	5
1.4 Processo fermentativo.....	7
1.5 Produção de compostos que conferem sabor e aroma.....	9
1.6 Uso de cepas selecionadas.....	15
1.7 Caracterização molecular de cepas.....	18
OBJETIVOS.....	22
2 Objetivos.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3 Material e Métodos.....	25
3.1 Coleta das amostras.....	25
3.1.1 Amostras de solo.....	25

3.1.2	Amostras de cana.....	25
3.1.3	Amostras de cachaça.....	25
3.2	Meios de cultura.....	26
3.3	Análise do teor de Zn nas amostras de solo e cana.....	27
3.3.1	Amostra de solo.....	27
3.3.1.1	Preparo da amostra.....	27
3.3.1.2	Digestão e análise da amostra de solo.....	27
3.3.2	Amostra de cana.....	28
3.3.2.1	Preparo da amostra.....	28
3.3.2.2	Digestão e análise da amostra de cana.....	28
3.4	Isolamento das leveduras.....	29
3.5	Testes bioquímicos para identificação taxonômica das leveduras.....	29
3.6	Testes de floculação.....	29
3.7	Avaliação da produção de H ₂ S.....	30
3.8	Testes de tolerância a diferentes tipos de estresse para as leveduras selecionadas.....	30
3.8.1	Teste de tolerância ao álcool.....	30
3.8.2	Tolerância à temperatura.....	30
3.9	Teste de resistência a 5,5',5''- trifluoro-DL-leucina (TFL) e a Cerulenina.....	31
3.9.1	Teste de crescimento na presença de TFL.....	31
3.9.2	Teste de crescimento na presença de cerulenina.....	31
3.10	Determinação da atividade enzimática da invertase.....	31
3.10.1	Pré-inoculo e crescimento das leveduras.....	31
3.10.2	Preparo de extratos celulares para determinação da atividade enzimática da invertase.....	32
3.10.3	Dosagem da invertase.....	32
3.11	Dosagem de proteínas.....	33
3.12	Teste de produção de micocinas por leveduras selecionadas.....	33

3.13	Identificação molecular das cepas.....	34
3.13.1	PCR - ITS (colônia).....	34
3.13.2	Eletroforese em gel de agarose.....	34
3.13.3	Purificação do produto de PCR.....	34
3.13.4	Digestão do fragmento de ITS.....	35
3.13.5	Eletroforese em gel de acrilamida.....	35
3.14	Análise do Polimorfismo molecular das cepas.....	36
3.14.1	RAPD-PCR.....	36
3.14.1.1	Preparação do DNA genômico de leveduras.....	36
3.14.1.2	PCR.....	37
3.14.1.3	Eletroforese em gel de acrilamida.....	37
3.14.2	<i>COX</i> -PCR.....	37
3.14.2.1	Preparação do DNA mitocondrial (DNAMt) (extração e purificação).....	37
3.14.2.2	PCR.....	38
3.14.2.3	Eletroforese em gel de acrilamida.....	39
3.14.3	Cariotipagem.....	39
3.15	Parâmetros fermentativos.....	40
3.15.1	Determinação da curva de crescimento das leveduras selecionadas.....	40
3.15.1.1	Preparo do inóculo.....	40
3.15.1.2	Determinação da curva de crescimento.....	40
3.15.2	Determinação do consumo sacarose.....	40
3.15.3	Determinação de etanol.....	41
3.15.4	Determinação de álcoois e ésteres.....	41
3.15.4.1	Preparo das amostras fermentadas.....	41
3.15.4.2	Preparo das amostras de cachaça.....	42
3.15.4.3	Reagentes e padrões.....	42
3.15.4.4	Condições cromatográficas.....	42
3.15.4.5	Procedimento para identificação e quantificação dos álcoois e ésteres.....	43
3.16	<i>Northern Blot</i>	43

3.16.1	Extração e preparação do RNA	43
3.16.2	Eletroforese de RNA.....	44
3.16.3	Preparo da sonda.....	45
3.16.4	Preparo da sonda radioativa.....	45
3.16.5	<i>Northern Blot</i> e hibridação com sonda radioativa.....	46
3.17	Reprodutividade dos resultados.....	47
	RESULTADOS	48
4	Resultados.....	49
4.1	Isolamento e identificação das leveduras.....	49
4.2	Outros critérios de seleção.....	54
4.2.1	Produção de H ₂ S.....	54
4.2.2	Tolerância a etanol e a temperaturas elevadas.....	54
4.2.3	Seleção de cepas resistentes a TFL e Cerulenina.....	55
4.2.4	Dosagem de invertase.....	57
4.2.5	Floculação.....	57
4.2.6	Produção de micocinas.....	60
4.2.7	Identificação molecular de leveduras.....	60
4.3	Polimorfismo molecular das cepas.....	66
4.3.1	Diferenciação por RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA).....	66
4.3.2	Diferenciação por PCR do gene mitocondrial <i>COXI</i>	66
4.3.3	Diferenciação por Cariotipagem.....	68
4.4	Parâmetros fermentativos.....	71
4.4.1	Determinação da curva de crescimento.....	71
4.4.2	Determinação do consumo de sacarose.....	71
4.4.3	Determinação de etanol.....	73
4.4.4	Determinação de álcool isoamílico, acetato de isoamila, ácido capróico e caproato de etila.....	73

	DISCUSSÃO.....	76
5	Discussão.....	77
	CONCLUSÕES.....	91
6	Conclusões.....	92
	PERSPECTIVAS.....	93
7	Perspectivas.....	94
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
8	Referências bibliográficas.....	96
	ANEXO.....	114
9	Anexo.....	115
9.1	Análise de Zn.....	115

INTRODUÇÃO

1- Introdução

Em Minas Gerais, a produção de cachaça de alambique é uma atividade tradicional que se encontra em expansão. A produção mineira de cachaça por motivos históricos e culturais ainda segue métodos muito rudimentares, e a despeito de muitas iniciativas atualmente em curso, não apresenta desenvolvimento tecnológico suficiente para disputar o mercado com os grandes produtores da chamada cachaça industrial. Contudo, os pequenos produtores, particularmente aqueles do Estado de Minas Gerais, vem procurando adotar novas tecnologias que possibilitem melhorar as condições de fermentação e destilação para se obter uma bebida padronizada, e deste modo assegurar a qualidade e fazer com que o produto tenha uma aceitação ainda maior no mercado.

1.1- Importância econômica da cachaça

A cachaça é uma bebida genuinamente brasileira e a sua denominação foi regulamentada pelo Decreto Federal nº 4072 de janeiro de 2002, que diz: “A cachaça é uma bebida de fabricação exclusivamente brasileira, com graduação alcoólica controlada que varia de 38% a 48% v/v, a uma temperatura de 20° C, obtida pela destilação do caldo de cana fermentado, em alambique de cobre, sem adição de açúcar, corante ou outro ingrediente qualquer”.

Em Minas Gerais, a produção de cachaça é uma atividade tradicional que se encontra em expansão, sendo que o número de alambiques aumentou de 1.500 para 8.466 nos últimos 14 anos com uma produção atual de cerca de 230 milhões de litros por ano. Combinando a produção de cachaça com outras atividades agropecuárias, os produtores empregam direta e indiretamente cerca de 240.000 pessoas e geram uma renda anual total estimada de R\$ 1,5 bilhões em toda a cadeia produtiva (SEBRAE, 2002). Da produção total de cachaça no estado, cerca de 43% é proveniente de estabelecimentos registrados, enquanto que 57% de clandestinos. Em termos numéricos absolutos, os estabelecimentos registrados correspondem a apenas 15% do total.

A cachaça possui uma grande importância econômica com boas perspectivas para o mercado externo, principalmente pela popularidade de seu “*drink*” mais conhecido a “caipirinha”. O aumento no consumo de aguardente de qualidade, o crescente apoio governamental para o setor, especialmente do governo de Minas Gerais, e a possibilidade de exportação estão cada vez mais exigindo que o processo de fabricação de cachaça seja baseado em boas práticas de fabricação. Para tanto, a fiscalização exercida pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAAB) está cada vez mais criteriosa e exigente. Com isto, pretende-se obter um produto mais padronizado e com qualidade comprovada com relação aos aspectos físico-químicos e sensoriais. No entanto, e como dito anteriormente, a maioria dos alambiques obtém cachaça de forma clandestina, e sem o controle de qualidade exigido pelos técnicos do MAAB.

A produção total de cachaça no Brasil destina-se quase que totalmente ao mercado interno, onde o consumo é um hábito amplamente difundido especialmente entre a população de baixo poder aquisitivo visto ser uma bebida de preço relativamente baixo. Atualmente, um novo grupo de consumidores das classes sócio-econômica média e alta vem se destacando, motivados pela melhoria da qualidade da bebida. A melhoria na qualidade da cachaça motivou também as exportações que têm crescido em média 10% ao ano. Até o final desta década a expectativa dos produtores é de crescimento acelerado, podendo as exportações chegar a 42 milhões de litros do produto. Atualmente, a exportação da bebida representa apenas 0,8 % da produção total de cachaça e a perspectiva é de destinar 4% da produção nacional para o mercado externo (dados fornecidos pela AMPAQ - Associação Mineira dos Produtores de Cachaça de Qualidade). Dessa forma, a expectativa do setor produtivo é que a cachaça de alambique estimulada pelas oportunidades oferecidas pelo mercado interno, pelas exportações e apoiada ainda por programas de reestruturação da cadeia produtiva, tenha para Minas Gerais a mesma importância que tem o whisky para a Escócia, o conhaque para a França, a tequila para o México e o saquê para o Japão.

1.2- A Cachaça de Alambique de Minas

Em Minas Gerais, a produção da cachaça foi regulamentada pela edição da Lei da Cachaça de Minas, Lei Estadual nº 11.949, de 11/07/2001 que estabelece o padrão de identidade e as características do processo de elaboração da “*Cachaça de Minas*”. A partir desta lei, tornou-se possível ao produtor vislumbrar a profissionalização e a remodelagem dos estabelecimentos tradicionais, com maiores facilidades de comercialização do produto e legitimação dos padrões de identidade e qualidade da cachaça mineira (SEBRAE, 2002).

A cachaça de alambique produzida em Minas, em região demarcada, conterà em seu rótulo a indicação de sua origem. Por região demarcada entende-se uma região geográfica que produza um destilado alcoólico com características naturais, culturais e qualitativas particulares, cujo nome da região será utilizado na menção da proveniência da cachaça (Oliveira e Magalhães, 2002). A área referencial para o zoneamento da produção da Cachaça de Alambique de Minas é a microrregião homogênea definida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

As expressões “Cachaça Artesanal de Minas” e “Certificado de Controle de Origem”, será emitido pelo órgão fiscalizador e poderá ser obtido pelos produtores, empresas ou instituições (padronizadores) que adotarem o processo de elaboração da Cachaça Artesanal de Minas, de acordo com as características culturais e geográficas de cada uma das regiões produtoras do Estado.

O Decreto Federal nº 42.644 de 05/06/2002 regulamentou a Lei nº 13.949 de 11/07/2001, a qual estabelece o padrão de identidade e a regulamentação da qualidade da cachaça. Segundo a legislação federal a cachaça deve apresentar composição química seguindo os seguintes teores máximos:

Acidez volátil em ácido acético.....	0,150g/100ml de álcool anidro
Ésteres em acetato de etila.....	0,200g/100ml de álcool anidro
Aldeídos em aldeído acético.....	0,030g/100ml de álcool anidro
Álcoois superiores.....	0,300g/100ml de álcool anidro
Furfural.....	0,005ml/100ml de álcool anidro
Metanol.....	0,010ml/100ml de álcool anidro
Cobre.....	5,00mg/l do produto.

Uma outra iniciativa adotada pelo governo mineiro foi a criação do Programa Estadual de Incentivo à Produção de Aguardente de Qualidade (Pró-Cachaça), Lei nº 10.853/92, regulamentada pelo Decreto Estadual nº 34.645/93, que incentivou a organização e mobilização dos produtores de cachaça em entidades ou cooperativas. Esta medida proporcionou aos pequenos produtores algumas facilidades de comercialização do produto e de conhecimentos para melhorar e/ou aprimorar a qualidade do destilado produzido.

1.3- Produção de cachaça de alambique

A matéria-prima usada para a fabricação de cachaça é a cana-de-açúcar na fase ideal de maturação. A cana destinada ao processo deve ser cultivada em solos corrigidos e adubados em quantidades de nutrientes adequadas, para se obter uma boa produtividade, bem como uma boa qualidade no produto final. A cana usada na produção do destilado artesanal é colhida manualmente. Imediatamente depois de cortada, a cana madura e limpa deve ser moída num prazo máximo de 24 a 36 horas. As moendas separam o caldo do bagaço que será usado para aquecer as fornalhas do alambique. O caldo da cana é decantado e filtrado para em seguida ser levado às dornas de fermentação.

O caldo de cana-de-açúcar a ser fermentado apresenta normalmente valores de pH entre 5,2 e 5,8. A fermentação ideal ocorre com o caldo de cana numa concentração de açúcar em torno de 14° a 16° Brix (o Brix mede o teor de sólidos solúveis). Acima de 16°

Brix, se faz necessário diluir o caldo de cana para garantir a estabilidade do fermento ao longo de todo o período fermentativo (Pataro *et al.*, 2002).

No processo tradicional de produção de cachaça é utilizado como inóculo para a fermentação o chamado “pé-de-cuba” ou “fermento caipira”, o qual visa a propagação da microbiota presente nos substratos e equipamentos utilizados na produção da bebida (Maia *et al.*, 1994). Os ingredientes utilizados na preparação do fermento variam conforme a fórmula de cada produtor, segundo tradições locais. Alguns substratos utilizados tradicionalmente no “pé-de-cuba” como o farelo de arroz e o fubá de milho são usados para enriquecer nutricionalmente o mosto. Alguns produtores utilizam o caldo de laranja ou limão para abaixar o pH. Em geral, os produtores levam de 5 a 30 dias preparando o fermento; após este tempo, a biomassa é obtida pela propagação sucessiva no caldo de cana e distribuída pelas demais dornas da destilaria, iniciando o ciclo fermentativo (Ribeiro, 1997; Cardoso, 2001). Alternativamente, o fermento de panificação prensado pode ser usado como inóculo; no entanto, este tipo de fermento foi desenvolvido para atender as características da indústria de panificação (Pataro *et al.*, 2002).

Em geral a fermentação é conduzida por um processo de batelada com reaproveitamento de inóculo, na qual o mesmo fermento é usado sucessivamente caracterizando o processo fermentativo. Normalmente, a duração média do processo fermentativo do caldo de cana é de 24 horas. O volume inicial do inóculo inicial, quando sedimentado, equivale normalmente a 20% do volume da dorna de fermentação. A dorna é alimentada lentamente pelo caldo-de-cana, podendo estar pré-aquecido ou não, de acordo com o clima da região. Ao final da fermentação, o mosto é encaminhado, através de tubulações, para destilação e um novo processo de fermentação é iniciado.

A destilação do mosto é realizada tradicionalmente em alambiques de cobre. O mosto é aquecido até a mistura entrar em ebulição e iniciar a emissão de vapores, os quais são condensados por resfriamento. O destilado formado é dividido em três partes, popularmente denominadas: “cabeça”, “coração” e “cauda”. A primeira fração é descartada por conter grande quantidade de metanol e outros compostos mais voláteis como álcoois superiores, os quais em grande quantidade podem ser prejudiciais à qualidade da bebida. A

“cauda” é desprezada ou redestilada por conter grande quantidade de água e produtos menos voláteis. O “coração”, que corresponde à parte mais nobre da cachaça, é encaminhada para o envelhecimento.

O envelhecimento é o processo que aprimora o sabor das bebidas e, além disso, é a etapa final na elaboração da cachaça, sendo que o tempo de envelhecimento e o tipo de madeira empregada nos barris são igualmente determinados pelo produtor. Ao término desta etapa, as amostras de cachaça são encaminhadas para análise dos padrões de identidade e qualidade que se aprovadas pelos parâmetros instituídos na legislação, permitem que a bebida seja engarrafada e comercializada. A comercialização do produto é regulamentada por lei e o produto deve seguir normas e estar registrado nos órgãos competentes (Gravatá, 1999; Cardoso, 2001).

1.4- Processo fermentativo

O processo fermentativo consiste na transformação dos açúcares fermentáveis no mosto, constituído de caldo-de-cana e nutrientes, em álcool etílico, gás carbônico e outros compostos secundários. A população de microorganismos responsável pela fermentação do caldo-de-cana é constituída normalmente por uma grande diversidade de leveduras e bactérias (Sabate *et al.*, 1998). Estes microrganismos são capazes de tolerar altas concentrações de açúcares, baixos valores de pH e altas concentrações de etanol (Angelis, 1992; Pataro *et al.*, 1998).

A fermentação denominada espontânea caracteriza-se por ser conduzida pela microbiota presente naturalmente nos substratos e/ou equipamentos utilizados no processo de produção da bebida. Este tipo de fermentação é tradicionalmente utilizado na produção de cachaça no Brasil, vinhos na Europa, bem como na produção de diversas bebidas africanas (burukutu, sukete) e de tequila no México (Querol *et al.*, 1992a e b; Sanni & Lonner, 1993; Lachance, 1995; Morais *et al.*, 1997; Sefa-Dedeh *et al.*, 1999).

O estágio final do processo fermentativo espontâneo invariavelmente é dominado por cepas tolerantes a altas concentrações de álcool, as quais pertencem ao grupo de

leveduras *Saccharomyces sensu stricto* (Pretorius, 2000). Este grupo consiste de quatro espécies de leveduras: *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus* e *Saccharomyces pastorianus* (Vaughan-Martini e Martini 1987).

Dentre as leveduras que participam do processo fermentativo, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a predominante e responsável pela fermentação tanto do vinho quanto da cachaça (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.*, 2000; Lambrechts e Pretorius, 2000; Schwan *et al.*, 2001). Sabe-se ainda que a população de leveduras presente no processo fermentativo está em constante mudança devido à introdução de novas cepas pela adição de caldo-de-cana e também devido ao fato do processo não ser estéril (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.*, 1998). Por esta razão safras distintas podem produzir cachaças com composição e características diferentes. Porém, associando se à diversidade populacional das cepas, as práticas operacionais nos alambiques também contribuem para a grande variedade da cachaça produzida.

Estudos têm sido conduzidos em diversas destilarias de cachaça localizadas em diferentes regiões do estado de Minas Gerais, visando à caracterização fisiológica e molecular da microbiota envolvida no processo fermentativo (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.*, 1998; Vicente *et al.*, 2005). Os resultados do acompanhamento da produção de cachaça em algumas destilarias do Estado têm mostrado que durante o processo fermentativo ocorre uma sucessão de espécies de leveduras, culminando com a predominância de *S. cerevisiae*. Corrêa (1999) observou que os perfis moleculares das linhagens isoladas no final da safra eram diferentes dos perfis das linhagens que iniciaram a safra do ano seguinte, sugerindo que as linhagens de *S. cerevisiae* predominantes no final da safra não foram responsáveis pelo reinício do ciclo fermentativo do ano seguinte em três destilarias estudadas. A análise do cariótipo das linhagens de *S. cerevisiae* predominantes nas dornas durante a fermentação mostrou que há uma grande variação do perfil molecular tanto entre as linhagens isoladas de destilarias diferentes quanto entre aquelas isoladas de uma mesma dorna (Pataro *et al.*, 2000).

Em outro estudo, durante o ciclo de 24 horas, três destilarias estudadas apresentaram um aumento das populações de *S. cerevisiae* do início ao fim do processo

fermentativo, apesar da grande sucessão de leveduras encontrada. Foi observado que, a maioria das espécies que estão presentes durante as primeiras horas do ciclo fermentativo, desaparecem até o final do processo fermentativo. Esta diminuição provavelmente ocorre devido a altas temperaturas, pouca disponibilidade de nutrientes e à presença de metabólitos secundários, que podem provocar a inibição do crescimento de cepas de diferentes espécies. Apesar do grande polimorfismo molecular observado, *S. cerevisiae* foi a espécie responsável pela condução da fermentação sendo verificada a presença de diferentes linhagens ao longo do ciclo fermentativo de 24 horas (Guerra *et al.*, 2001).

1.5- Produção de compostos que conferem sabor e aroma

A cachaça, como toda bebida fermentada é formada por uma mistura complexa de substâncias que influenciam no aroma e sabor. Esta mistura é composta principalmente por água e álcool etílico, e componentes secundários os quais podem ser agrupados como álcoois superiores, ésteres de etila, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos. Estas substâncias representam menos de 1% de todos os compostos e são responsáveis pelas propriedades organolépticas típicas da cachaça (Nonato *et al.*, 2001). Em vinhos e “brandies”, os ésteres e álcoois superiores constituem-se em importantes produtos da fermentação das leveduras, e muito contribuem para o aroma destas bebidas. O aroma de frutas presente no vinho, no “brandy”, no sake e em outras bebidas é atribuído a compostos como o caproato de etila (maçã), acetato de isoamila (banana), caprilato de etila (maçã) e acetato de 2- feniletil (frutas, flores e mel) (Yoshizawa, 1999; Lilly *et al.*, 2000; Nonato *et al.*, 2001; Falqué *et al.*, 2001).

Na cachaça, o perfil e o teor dos componentes secundários podem ser alterados pelo processo de fabricação, pela composição do mosto e pelas condições de fermentação e destilação, sendo que a levedura utilizada possui um proeminente efeito na formação do “flavor” primário (Gomes, 2002). De acordo com Lilly *et al.* (2000), mudanças drásticas na composição durante a fermentação e destilação, geram constituintes químicos que reagem lentamente durante o envelhecimento, mudando o equilíbrio químico e resultando em

mudanças graduais no sabor e aroma finais. Neste sentido, já é conhecido que as maiores mudanças na produção de compostos secundários em vinhos correspondem às diferentes espécies de leveduras (Fleet e Heard, 1993; Zironi *et al.*, 1993), e dentro das espécies, às diferentes linhagens (Zea *et al.*, 1994). A influência da linhagem é, portanto fundamental e o papel das diferentes leveduras associadas à fermentação deve ser determinado para seleção das linhagens iniciadoras (Longo *et al.*, 1992; Romano *et al.*, 1994).

Na cachaça, assim como no vinho, os álcoois superiores constituem quantitativamente o maior grupo responsável pelo aroma da bebida. Estes compostos são formados pelas leveduras através de duas vias diferentes. Uma consiste na conversão de aminoácidos presentes no meio como valina, leucina, isoleucina, treonina e fenilalanina, em álcoois superiores através do mecanismo de Ehrlich, o qual também é conhecido como via catabólica. Este mecanismo envolve a transaminação inicial entre um aminoácido e um α -cetoácido com subsequente descarboxilação e redução. Na outra via os álcoois superiores são formados a partir de desaminações ou transaminações de aminoácido presentes extracelularmente (Casalone *et al.*, 1997; Yoshizawa, 1999; Lambrechts e Pretorius, 2000; Sluis *et al.*, 2002).

A síntese de álcool isoamílico, por exemplo, pode ser realizada a partir do α -cetoisocaproato, um precursor do álcool isoamílico sintetizado na via de síntese de L-leucina a partir de glicose; ou pelo mecanismo de Ehrlich, onde ocorre a descarboxilação e redução de α -cetoácidos. No mecanismo de Ehrlich, os aminoácidos extracelulares são absorvidos pelas leveduras e transaminados para formar os α -cetoácidos, os quais são descarboxilados e reduzidos a álcoois superiores como o n-propanol, álcool isobutílico e álcool isoamílico (Ashida *et al.*, 1987; Yoshikawa *et al.*, 1995; Casalone *et al.*, 1997; Yoshizawa, 1999; Sluis *et al.*, 2002).

A biossíntese de L-leucina a partir de glicose é catalizada por várias enzimas como, por exemplo, a enzima α -isopropilmalato sintase (α -IPM). O α -cetoisocaproato pode ser convertido em L-leucina ou álcool isoamílico, sendo que o acúmulo de L-leucina afeta a atividade da α -IPM por “feedback” negativo. A α -IPM sintase é a enzima chave no controle da via sintética do álcool isoamílico (Satyanarayana *et al.*, 1968). Vários estudos

foram realizados com a intenção de selecionar cepas mutantes resistentes a 5',5',5' - trifluoro-DL-leucina (TFL), um análogo de L-leucina. As cepas resistentes a TFL são insensíveis a retroinibição por L-leucina o que possibilita o acúmulo de álcool isoamílico (Satyanarayana *et al.*, 1968; Ulm *et al.*, 1972; Ashida *et al.*, 1987; Casalone *et al.*, 1997; Yoshizawa, 1999).

Segundo Yoshizawa (1999), cepas selvagens em presença de TFL promovem a sua incorporação em proteínas. Estas proteínas não funcionam normalmente e a síntese de L-leucina é inibida, portanto a célula não sobrevive à exposição a este composto. Por sua vez, mutantes resistentes a TFL não apresentam a inibição por L-leucina, desta forma, a célula não somente sobrevive como produz grandes quantidades de álcool isoamílico e de L-leucina.

A atividade da enzima α -IPM além de ser regulada pelo mecanismo de “feedback” de inibição por leucina (Ulm *et al.*, 1972), a regulação também pode ocorrer pela Coenzima-A (CoA) (Figura 1). A inativação por CoA, um mecanismo de controle adicional, é dependente de Zn^{2+} (Cavalieri *et al.*, 1999). Deste modo, o aumento na concentração de CoA, desencadeia uma inativação temporária da biossíntese de álcool isoamílico e um aumento no consumo de acetil-CoA, permitindo assim a sua canalização para o ciclo do citrato. Contudo, a inibição por CoA ocorre apenas quando o Zn^{2+} está presente (Tracy e Kohlhaw, 1977).

A existência de dois mecanismos regulatórios pós-transcricionais sugere que, quando um mecanismo falha o outro pode operar. Porém, mutantes com a enzima α -IPM sintase alterada em um dos dois mecanismos são resistentes ao análogo de L-leucina (TFL), o que favorece a produção de grande quantidade de L-leucina, indicando que ambos os mecanismos são necessários para a apropriada modulação da atividade da enzima “in vivo” (Cavalieri *et al.*, 1999).

Ichikawa *et al.* (1991) na busca pelo desenvolvimento de leveduras que produzissem elevados teores de álcoois superiores e ésteres, isolaram cepas de leveduras resistentes a cerulenina, com uma maior capacidade de produção de ácido capróico e de caproato de etila no processo de produção do sake e sugeriram que o ácido capróico tem

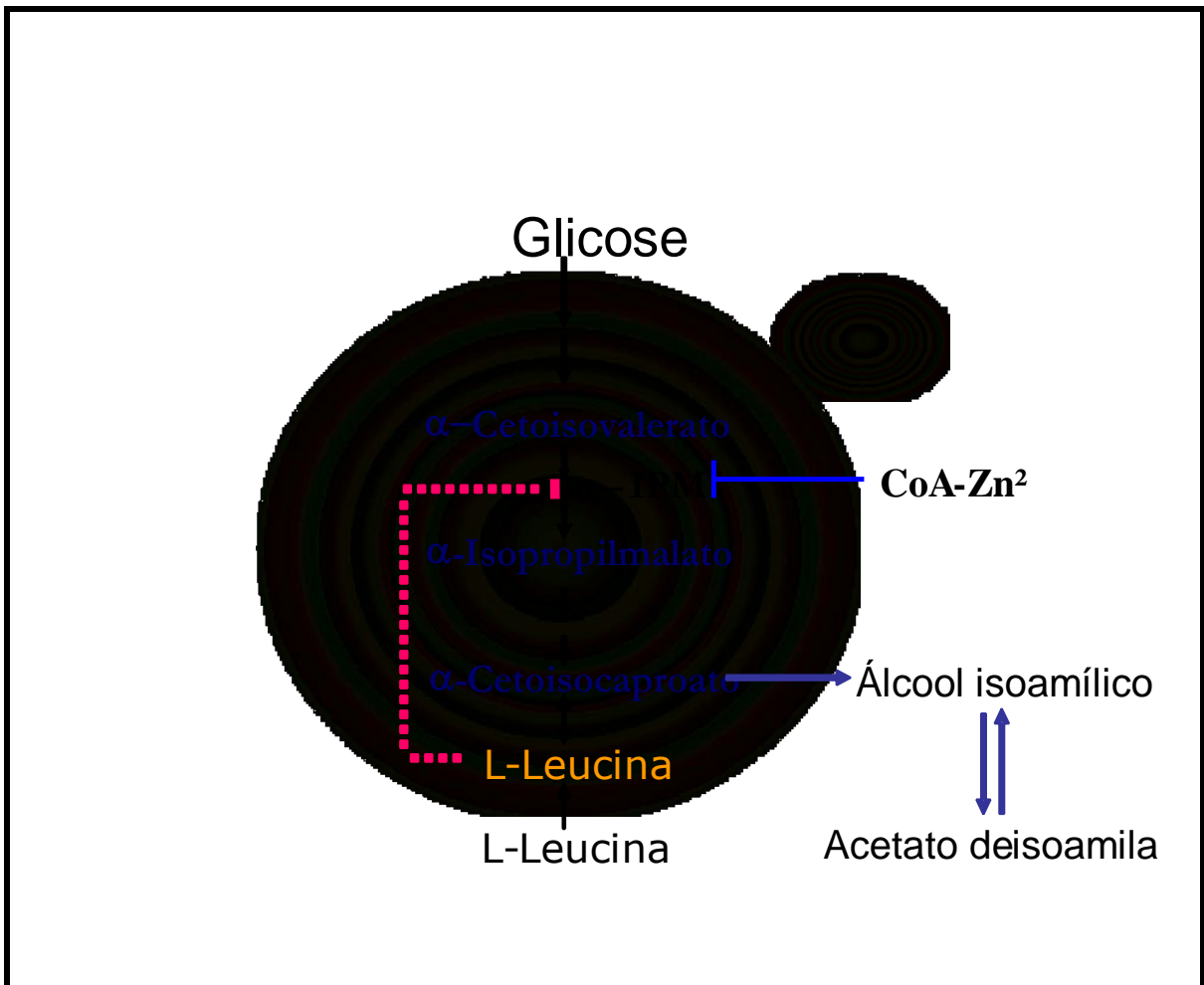


Figura 1: Biossíntese de L-leucina e formação de álcool isoamílico e acetato de isoamila. A α -IPM sintase é a enzima chave no controle desta via sintética. O acúmulo de L-leucina e o Zn^{2+} complexado a CoA inibem a atividade da α -IPM.

Fonte: Ashida *et al.*, 1987 e Cavalieri *et al.*, 1999 (adaptado).

relação com a síntese de ácidos graxos. A síntese de ácidos graxos na levedura é catalisada por uma enzima multifuncional, a ácido graxo sintetase. Sendo que a cerulenina é um inibidor específico desta enzima (Figura 2). A análise de cepas mutantes resistentes a cerulenina identificou a mutação no gene *FAS2*, o qual codifica a enzima ácido graxo sintetase, como responsável por essa resistência e alta produção de caproato de etila (Asano *et al.*, 1999 e 2000; Arikawa *et al.*, 2000; Akada *et al.*, 1999 e 2001).

Os ésteres, dentre estes o éster de acetato, contribuem para distinguir o aroma de bebidas alcoólicas, mesmo quando em baixas quantidades. Contudo pequenas mudanças na concentração destes ésteres podem ter um notável efeito no sabor do produto (Lyness *et al.*, 1997). Os ésteres são formados intracelularmente em uma reação catalisada por uma enzima e dois substratos, um álcool superior e uma molécula de acetil coenzima A (Mason e Dufor, 2000). O entendimento do processo regulatório da síntese destes ésteres é importante para melhorar o controle de sua produção durante o processo fermentativo.

A enzima envolvida na síntese de éster é a álcool acetiltransferase (AATase). Esta enzima reage com a molécula de acetil-CoA e dependendo do grau de afinidade, reage com vários álcoois superiores para produzir ésteres (Lilly *et al.*, 2000). Tem sido demonstrado que, durante a fermentação, a taxa de produção de éster de acetato corresponde à atividade da AATase (Verstrepen *et al.*, 2003b). Contudo, a atividade desta enzima é reprimida pela aeração e pela adição de ácidos graxos insaturados ao meio, levando conseqüentemente a uma redução na síntese de ésteres de acetato (Fujii *et al.*, 1997; Kajiwara *et al.*, 1997; Mason e Dufor, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003a).

A purificação da enzima envolvida na síntese de ésteres de acetato levou à identificação de duas distintas AATase: AATase I e AATase II. Estas AATases são codificadas pelos genes *ATF1* e *ATF2*, respectivamente (Mason e Dufor, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003a). Entre estes, o gene *ATF1* é o que mais tem sido estudado (Fujii *et al.*, 1997 e 1994; Lyness *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1998; Lilly *et al.*, 2000).

A álcool acetiltransferase I, codificada pelo gene *ATF1* tem sido reportada por ser o maior responsável pela produção de acetato de isoamila e de acetato de etila. Em adição, Alvarez *et al.*, (2003) observaram uma clara correlação entre a concentração de acetato de

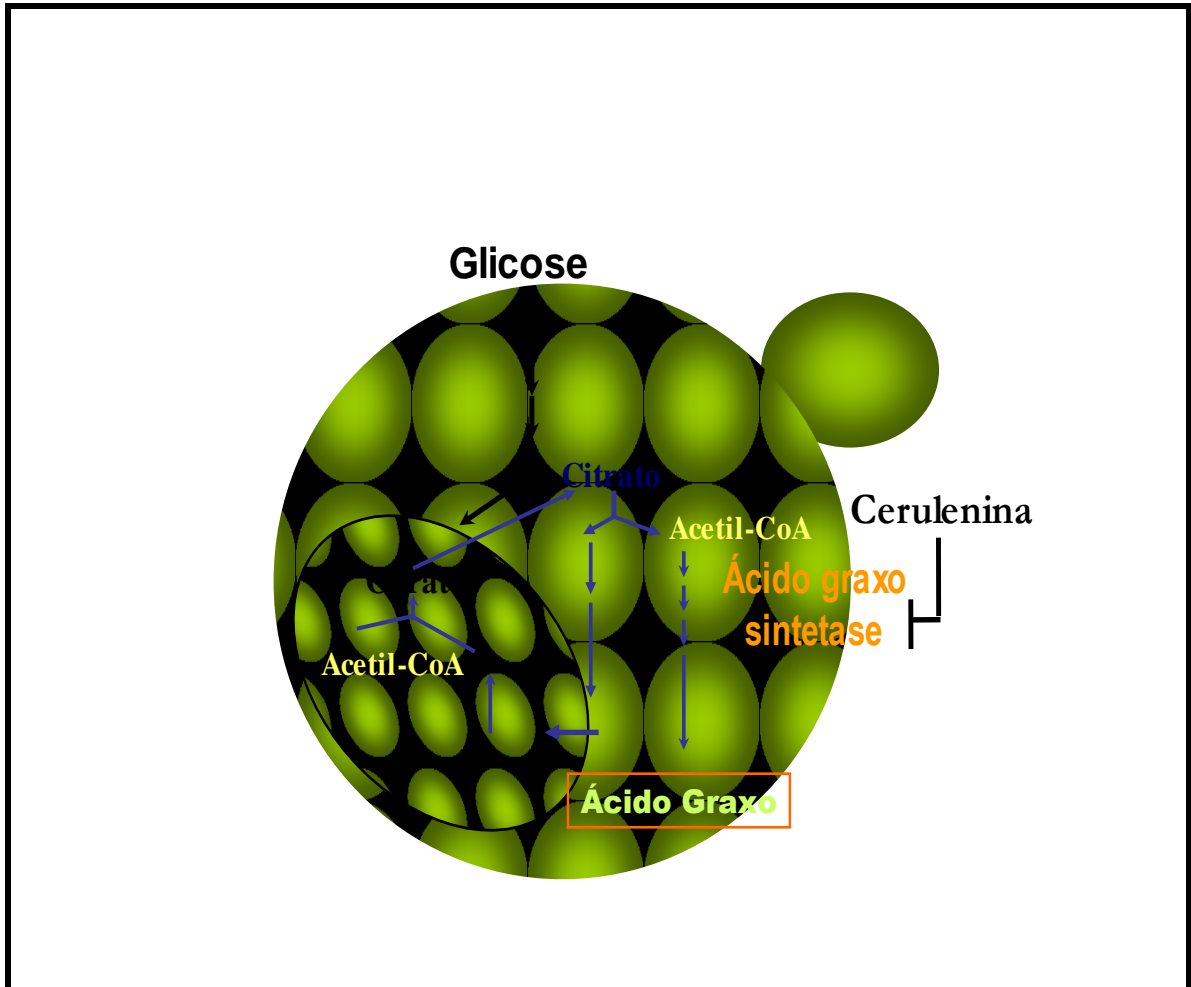


Figura 2: Biossíntese de ácido graxo em leveduras. A síntese de ácidos graxos na levedura é catalisada por uma enzima multifuncional, a ácido graxo sintetase. A cerulenina é um inibidor específico desta enzima.

Fonte: Ichikawa *et al.*, 1991e Lyness *et al.*, 1997 (adaptado).

etila e de acetato de isoamila em cervejas, indicando que estes ésteres podem ser sintetizados por uma mesma enzima. Lilly *et al.* (2000), estudaram a super expressão do gene *ATF1* durante o processo fermentativo e observaram um aumento na produção de acetato de etila e de acetato de isoamila de cerca de 10 a 12 vezes respectivamente.

Em outro estudo, Verstrepen *et al.* (2003a) analisaram o produto da fermentação de diferentes cepas de *S. cerevisiae*, por cromatografia gasosa e confirmaram que o nível de expressão de *ATF1* e *ATF2* afeta surpreendentemente a produção de acetato de etila e de acetato de isoamila. Sendo que os genes *ATF1* e *ATF2* juntos são os responsáveis pela atividade da enzima álcool acetiltransferase na produção destes ésteres. Contudo, cepas com deleção dupla dos dois genes apresentaram produção considerável de certos ésteres tais como acetato de etila, acetato de propila e acetato de isobutila, evidenciando a existência de um mecanismo adicional na síntese destes ésteres.

De acordo com Plata *et al.*, (1998) e Fukuda *et al.*, (1998), os ésteres podem também ser sintetizados por esterases, via uma reação reversa na ausência de acetil coenzima A. O acetato de isoamila, por exemplo, pode ser sintetizado a partir de ácido acético e álcool isoamílico numa reação catalisada por uma esterase. Os ésteres são também hidrolizados por esterases específicas; deste modo, a produção de maiores teores de ésteres como o acetato de etila, o acetato de isoamila e o caproato de etila dependem da disponibilidade dos precursores e do controle das atividades das enzimas envolvidas na síntese e na hidrólise destes compostos. (Lyness *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1998; Yoshizawa *et al.*, 1999; Lilly *et al.*, 2000).

1.6 - Uso de cepas selecionadas

O uso de cepas selecionadas que contribuam para a manutenção da identidade e da qualidade da cachaça produzida pode se constituir em uma alternativa importante para o processo fermentativo. A fermentação com linhagens selecionadas tem como vantagem favorecer um início mais rápido do processo, evitar os riscos de contaminação apresentados pela fermentação espontânea, taxas de fermentação mais rápidas e uniformes, maior

rendimento e qualidade do produto resultante e eliminação de variações no sabor da bebida (Fleet e Gillian, 1985; Martinez *et al.*, 1990; Sanni e Lonner, 1993; Romano *et al.*, 2003).

A busca de linhagens iniciadoras e a caracterização de leveduras que prevalecem no processo fermentativo da cachaça poderão permitir uma interferência bem sucedida no processo e estabelecimento de padrões de qualidade elevados para o produto final. Contudo, há necessidade de estabelecimento de parâmetros que levem a escolha de cepas que se adaptem às condições de produção, e que contribuam para manter ou melhorar a qualidade da cachaça. O ideal é que cada destilaria selecione sua própria cepa considerando a prevalência e as características fermentativas adequadas para produção de uma cachaça de boa qualidade.

Na moderna fabricação de vinhos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é muito usada na fermentação e alguns estudos mostram que várias cepas desta levedura produzem quantidades diferentes de compostos voláteis na bebida. Estes estudos ainda demonstram que a inoculação de cepas selecionadas contribui para melhorar as características do vinho, sendo portanto importante conhecer os diferentes potenciais de produção de compostos voláteis das cepas de *S. cerevisiae* para escolher a melhor cepa para a produção de um vinho com mais qualidade (Fraile *et al.*, 2000; Ostergaard *et al.*, 2000; Vianna e Eberler, 2001; Falque *et al.*, 2001; Hernandez-Orte *et al.*, 2002; Patel e Shibamoto, 2002).

A levedura *S. cerevisiae* é tradicionalmente utilizada na fabricação de cerveja, vinho, destilados e pão, sendo necessário que cada cepa tenha características específicas para cada processo. A produtividade e a eficiência da fermentação, a tolerância ao etanol e à temperatura, a resistência a altas concentrações de açúcar, a habilidade de flocular, a de produzir certos componentes do aroma da bebida e a resistência as micocinas de leveduras contaminantes são algumas características desejáveis as linhagens de leveduras selecionadas para o processo fermentativo de produção de bebidas. É importante considerar também algumas características indesejáveis como, por exemplo, alta acidez volátil e produção de sulfeto de hidrogênio durante o processo de seleção de leveduras (Ribeiro e Horii, 1999; Ostergaard *et al.*, 2000).

Algumas regiões produtoras de vinhos na Austrália e na Nova Zelândia (Thornton, 1991), têm utilizado linhagens selecionadas como iniciadoras da fermentação. O início da produção de leveduras desidratadas há duas décadas atrás foi uma etapa importante para tentar superar o problema de contaminação das fermentações de vinho (Schutz e Gafner, 1993). Além do vinho, há relatos de utilização de leveduras selecionadas para a produção de cachaça, como o trabalho desenvolvido em destilarias do Estado de Minas Gerais por Gomes (2002), no qual foi mostrado que duas linhagens de *S. cerevisiae* foram capazes de permanecer dominando a fermentação por até 30 dias consecutivos. Após este período, linhagens selvagens de *S. cerevisiae* apresentaram populações iguais ou superiores às das linhagens iniciadoras testadas.

Segundo Lambrechts e Pretorius (2000), culturas iniciadoras têm sido desenvolvidas para fermentar com maior rapidez e eficiência, produzindo vinhos com características desejáveis. Contudo, leveduras indígenas não - *S. cerevisiae* podem ter um efeito favorável no desenvolvimento do sabor final (Lambrechts e Pretorius, 2000; Romano *et al.*, 2003). O efeito de interações sinérgicas entre diferentes cepas de leveduras e seu efeito nas propriedades sensoriais da bebida precisa ainda ser investigado.

As culturas iniciadoras conseguem dominar o processo fermentativo porque são adicionadas em altas concentrações, prevalecendo sobre a microbiota indígena. No entanto, estudos mostram que apesar disso, a flora transitória têm uma participação importante no processo (Barros Lopes *et al.*, 1996). Segundo Longo *et al.* (1992), estas linhagens mostram uma maior adaptação ao meio e às condições particulares da fermentação, além de produzir aromas e sabores típicos da região. Pesquisas têm sido desenvolvidas em várias partes do mundo a fim de desenvolver tecnologias para agregar aos produtos uma alta qualidade para enfrentar as exigências do mercado consumidor. Os resultados dessas pesquisas têm demonstrado que a qualidade das bebidas está relacionada com a padronização do processo e com a ecologia microbiana presente no mosto fermentado, já que as diferentes espécies e suas populações determinam os tipos e concentrações das várias substâncias que contribuem para o sabor e o aroma das bebidas (Romano *et al.*, 1998; Lambrechts e Pretorius, 2000).

1.7- Caracterização molecular de cepas

Atualmente, um grande número de cepas selecionadas de leveduras tem sido utilizado para produção de bebidas alcoólicas. A caracterização destas cepas é necessária para controle da qualidade do produto final e para controlar o processo fermentativo, assegurando que este foi realmente conduzido pelas cepas inoculadas (Querol *et al.*, 1992a). Assim, o uso de técnicas que tornem possível a distinção entre cepas inoculadas e cepas remanescentes presentes da flora indígena é importante e possui um grande interesse industrial (Plengvidhya *et al.*, 2003).

As cepas utilizadas no processo fermentativo estão associadas ao nicho ecológico e possuem um importante papel tanto na fermentação espontânea quanto na inoculada (Cocolin *et al.*, 2004). Estas cepas de *S. cerevisiae* diferem entre si significativamente em sua performance fermentativa e em sua contribuição para o sabor final e qualidade da bebida. Contudo a caracterização de cepas selecionadas é difícil visto que, a maioria destas pertencem à espécie *S. cerevisiae*, o que torna limitado o uso de métodos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos clássicos para distinção entre as cepas (Barros Lopes *et al.*, 1996; Fernández-Espinar *et al.*, 2001). Com o aumento da introdução de culturas iniciadoras no processo fermentativo houve uma grande necessidade de desenvolvimento rápido de métodos simples e eficientes para monitoramento no decorrer da fermentação (López *et al.*, 2003). Por esta razão métodos moleculares têm sido adotados para identificação e caracterização de cepas.

Atualmente, além dos testes fisiológicos para identificação e separação de linhagens de levedura, técnicas moleculares como cariotipagem, análises de DNA mitocondrial e análise de DNA genômico têm sido utilizadas (Querol *et al.*, 1992a; Fernández-Espinar *et al.*, 2001; Guerra *et al.*, 2001; Legras e Karst, 2003; Mariangeli *et al.*, 2003; Cocolin *et al.*, 2004; Schüller *et al.*, 2004a). Cada um destes métodos permite uma distinção mais precisa entre as linhagens de *S. cerevisiae*, uma vez que a sistemática de leveduras baseada em critérios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos provou ser inadequada para a determinação de espécies, principalmente em grupos de leveduras de

perfil nutricional restrito, como é o caso do gênero *Saccharomyces*. Embora estes critérios continuem sendo usados para identificação de um isolado não conhecido (Barnett *et al.*, 1990), estas características fisiológicas são determinadas apenas por uma pequena fração do genoma (Barros Lopes *et al.*, 1998). Recentemente, características fenotípicas usadas na sistemática de leveduras têm sido combinadas com o emprego de técnicas moleculares que possibilitem o acompanhamento da dinâmica de populações de microrganismos durante o ciclo fermentativo (Querol *et al.*, 1992a; Comi *et al.*, 2000). Desta forma, é possível verificar a influência de parâmetros como nutrientes, temperatura e aeração das dornas no surgimento ou desaparecimento de espécies e correlacionar este acontecimento com a qualidade da cachaça produzida.

Diferentes estratégias baseadas na análise do polimorfismo de DNA têm sido utilizadas para diferenciar linhagens de *S. cerevisiae* envolvidas em fermentação alcoólica (Querol e Ramón, 1996). Estas estratégias são ferramentas poderosas, não somente para controle industrial e tecnológico, mas também para pesquisa ecológica dentro da diversidade intraespecífica da microbiota indígena de fermentações espontâneas, como por exemplo, aquela que ocorre na produção do vinho (Versavaud *et al.*, 1995; Pataro *et al.*, 2000, Guerra *et al.*, 2001).

Os estudos de cariótipos têm permitido descrever o comportamento das populações particulares e intervir no processo fermentativo, elucidando o caráter individual de cada fermentação espontânea ou por linhagem iniciadora específica (Schutz e Gafner, 1992; 1994). Estudos realizados por Thornton (1991) e Sabate *et al.* (1998) também demonstraram que diferentes linhagens de *S. cerevisiae* podem ser observadas durante o processo fermentativo de vinhos, sendo que poucas linhagens predominam no estágio final do processo. A análise do cariótipo das linhagens de *S. cerevisiae* predominantes nas dornas durante a fermentação do mosto mostrou que há uma grande variação do perfil molecular tanto entre as linhagens isoladas de destilarias diferentes quanto entre aquelas isoladas de uma mesma dorna (Pataro *et al.*, 2000). Este polimorfismo também foi observado nas linhagens de *S. cerevisiae* isoladas durante diferentes períodos de produção de cachaça (Corrêa, 1999). É possível que esta diversidade molecular encontrada em *S.*

cerevisiae seja devida às características peculiares do processo de produção da cachaça, como por exemplo, alta concentração de etanol e temperatura elevada (Pataro *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2001).

Após a padronização dos métodos de cariotipagem e análise do DNA mitocondrial para caracterização de cepas de leveduras, vários estudos têm mostrado que diferentes linhagens de *S. cerevisiae* estão envolvidas simultânea ou sucessivamente na fermentação espontânea do vinho, e ainda, que as linhagens variam com a região geográfica, condições climáticas, época do ano e substratos (Vezinhet *et al.*, 1992; Sabate *et al.*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2000; Schüller *et al.*, 2004b). Sabate *et al.* (1998), observaram uma ampla distribuição de algumas linhagens de *S. cerevisiae* em determinadas regiões vinícolas e a permanência destas linhagens ao longo de dois anos, sugerindo a ocorrência de linhagens nativas específicas, representantes de determinada região, havendo uma forte correlação entre a origem geográfica e as características genéticas das linhagens. A ampla existência de linhagens específicas de *S. cerevisiae* em diferentes regiões vinícolas representa uma adaptação dessas linhagens a microambientes específicos. Alguns pesquisadores acreditam que bons resultados podem ser obtidos usando linhagens originais destes microambientes como iniciadoras (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2000).

Em outro estudo, Versavaud *et al.* (1995) estudou a diversidade genética e distribuição geográfica de diferentes cepas de leveduras *S. cerevisiae* obtidas em uma área produtora de vinho na França. Em seus resultados foi observado que a população de *S. cerevisiae* desenvolvida durante o processo fermentativo é policlonal, ou seja, é constituída de várias cepas geneticamente distintas, crescidas simultaneamente, sendo que uma ou duas cepas predominaram no final processo fermentativo representando 50% da biomassa total. Contudo, nenhuma correlação entre diversidade genética e localização geográfica foi evidenciada neste estudo.

O desenvolvimento da PCR (Polymerase chain reaction) tem aberto novos caminhos para a discriminação de linhagens fermentadoras de vinho utilizando a amplificação de seqüências aleatórias ou específicas. Uma das vantagens da PCR é que várias áreas do genoma podem ser comparadas e analisadas. A PCR tem sido muito eficiente na

diferenciação de linhagens comerciais de origem vinícola e entre leveduras não *Saccharomyces* presentes no mosto (Barros Lopes *et al.*, 1998). Outro método que vem sendo muito usado na diferenciação molecular é a cariotipagem, sua aplicação permite a diferenciação de cada cepa pela variabilidade da constituição cromossomal. Apesar de eficiente esta técnica é complexa, requer equipamentos sofisticados e por ser bastante demorada não permite a análise simultânea de um grande número de amostras (Querol *et al.*, 1992a; Fernández-Espinar *et al.*, 2001; Schüller *et al.*, 2004a). De acordo com Guerra *et al.*, (2001) três isolados de cachaça inicialmente identificados como *S. cerevisiae* através de métodos fisiológicos e por cariotipagem, mostraram perfis de bandeamento completamente distintos daqueles observados em outras linhagens de *S. cerevisiae*, quando utilizada a técnica de RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA). A análise molecular combinando vários métodos moleculares em conjunto com métodos tradicionais de caracterização fisiológica e morfológica pode ser muito útil na discriminação de cepas *S. cerevisiae* de cepas da população indígena (Cappello *et al.*, 2004).

Visto que, estudos para seleção de cepas de leveduras utilizadas na produção de cachaça ainda são muito preliminares, Vicente *et al.* (2005) desenvolveram uma metodologia para selecionar cepas de *S. cerevisiae* utilizadas na produção de cachaça que produzam elevados teores de compostos aromatizantes (INPI-MG Protocolo 315, 17/03/2003).

Neste trabalho foi aplicada a metodologia descrita por Vicente *et al.* (2005) para seleção das cepas com características adequadas ao processo fermentativo e através de técnicas moleculares observamos a diversidade genética e a distribuição geográfica das cepas. Pretende-se no futuro utilizar as cepas selecionadas como linhagens iniciadoras do processo fermentativo da cachaça.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

- Isolar, selecionar e caracterizar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, com a finalidade de utilizá-las como fermento selecionado no processo de produção de cachaça de alambique.

2.2- Objetivos Específicos

- Quantificar agentes que conferem sabor e aroma específicos nas cachaças de determinadas regiões de Minas Gerais;
- Isolar cepas *Saccharomyces cerevisiae* a partir de processo de produção de cachaça em quatro destilarias de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais;
- Selecionar as cepas com características apropriadas para atender as condições empregadas no processo de produção da cachaça de alambique;
- Proceder à caracterização molecular das cepas selecionadas, examinando ainda a existência de diferenças a este nível através de técnicas distintas;
- Determinar os níveis de compostos que conferem sabor e aroma em produtos de fermentação com a utilização de cepas selecionadas;
- Comparar a expressão do gene *ATFI* entre as cepas selecionadas durante a fermentação em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

3- Material e Métodos

3.1- Coleta das amostras

As amostras de mosto foram coletadas em frascos de vidro estéreis, devidamente identificados. Os frascos foram mergulhados nas dornas coletando-se aproximadamente 150 ml de mosto. Esses frascos foram acondicionados em gelo, transportados até o laboratório e processados (maiores detalhes consultar ítem 3.4 de materiais e métodos).

As amostras de solo, cana e cachaça foram fornecidas pelos produtores das cidades de Araxá, Lavras, Jequitinhonha, Perdizes, Perdões e Salinas.

3.1.1- Amostras de solo

Do solo de cultivo da cana foram retiradas amostras na profundidade de 0 a 20 cm e de 20 a 40 cm em cada área selecionada, para análise quanto ao teor de Zn. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos rotulados indicando a profundidade e a localidade de cada amostra.

3.1.2- Amostras de cana

Foram colhidos três pedaços de cana de três plantas diferentes em regiões distintas do canavial. Foi selecionada para corte a parte acima dos dois primeiros gomos com o segundo corte a partir do terceiro gomo. As amostras foram acondicionadas em saco plástico com identificação e mantidas sob refrigeração até o momento de uso.

3.1.3- Amostras de cachaça

Os produtores forneceram amostras de cachaça envelhecidas por dois anos em barris de carvalho.

3.2- Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura:

- Meio YP

O meio YP (Yeast Peptone) é composto por extrato de levedura (1%), bacto-peptona (2%) e agar 2% (para meio sólido). Nos experimentos realizados neste trabalho foram utilizadas diferentes fontes de carbono em concentrações variadas.

- Meio YPD para isolamento de leveduras

O meio YP para isolamento de leveduras é composto por peptona 0,5%, extrato de levedura 0,1%, glicose 2% e agar 2%. No momento do plaqueamento foram adicionados 100 µg/ml do antibiótico ampicilina para prevenir contaminação por bactérias.

- Meio mínimo

O meio mínimo é composto por 0,67% de base nitrogenada sem aminoácidos, agar 1,5% (meio sólido), pH 6,5. Foram utilizadas como fonte de carbono (p/v): etanol 2%, galactose 2%, glicerol 2%, glicose 2%, lactose 2%, maltose 2%, manitol 2%, rafinose 2% e sacarose 2%. As fontes de carbono foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio no momento do plaqueamento.

- Meio Yeast Carbon Base (DIFCO Laboratories)

O meio Yeast Carbon Base (DIFCO Laboratories) sem nitrogênio, foi preparado conforme indicado pelo fabricante. As fontes de nitrogênio utilizadas foram: lisina e etilamina.

- Meio Bismuth Sulfite Agar (DIFCO Laboratories)
O meio Bismute Sulfite Agar (DIFCO Laboratories) utilizado para avaliar se as leveduras isoladas eram produtoras de H₂S, foi preparado conforme indicado pelo fabricante.
- Meio YEPD-MB (Yeast Extract Peptone Dextrose – Methylene Blue)
O meio YEPD-MB utilizado para verificar se as leveduras isoladas eram produtoras de micocinas (teste Killer), é composto por extrato de levedura (1%), peptona (2%), glicose (2%) e agar (3%). Para manter o pH 4,5 foi utilizado o tampão fosfato composto de citrato-fosfato 0,1M. No momento do plaqueamento foram adicionados 0,01% azul de metileno.

3.3- Análise do teor de Zn nas amostras de solo e cana

3.3.1- Amostra de solo

3.3.1.1- Preparo da amostra

A amostra de solo previamente identificada foi colocada em Becker de 1000 ml. A completa secagem da amostra foi efetuada em estufa com circulação de ar forçada, a temperatura de 30° C. Após a secagem, a amostra foi passada por uma peneira com malha de 2 mm. A parte retirada na peneira foi descartada e a TFSA (terra fina seca ao ar) foi dividida por quartenagem como descrito em Embrapa (1999). A amostra foi então transferida para saco plástico devidamente identificado e reservada.

3.3.1.2- Digestão e análise da amostra de solo

Foram pesados 5,0 g de TFSA e colocados em um erlemeyer de 125 ml. Logo após foram adicionados 50 ml de solução extratora duplo-ácida (HCl 0,05 M, H₂SO₄ 0,0125 M),

o frasco foi tampado e a mistura agitada em um agitador horizontal circular a 125 rpm durante 5 minutos (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25). Em seguida a mistura foi deixada em repouso a temperatura ambiente por aproximadamente 6 horas. Após esta etapa a suspensão formada foi filtrada a vácuo em papel de filtro Whatman nº 42. O filtrado foi separado para determinação de Zn por espectrofotometria de absorção atômica no aparelho Varian-SpectrAA-200.

3.3.2- Amostra de cana

3.3.2.1-Preparo da amostra

A cana previamente fornecida pelo produtor e mantida sob refrigeração foi lavada e picada. O caldo foi obtido por meio de moedor de cana manual (engenho), a cana usada para extração do caldo foi obtida da parte média sem os nós e com a casca. Para análise foi utilizado um volume de caldo correspondente a 0,5 g de cana. Para isso a cana foi pesada em balança analítica (Sartorius), antes da moagem e o volume obtido foi posteriormente quantificado.

3.3.2.2-Digestão e análise da amostra de cana

O volume correspondente a 0,5 g de cana foi transferido para um erlemeyer de 125 ml. Logo depois foram adicionados 25 ml de HCl 1M e o peso total foi anotado. A mistura foi então aquecida durante 15 minutos em banho-maria a 80° C (New Brunswick Innova-3000), em seguida foi levada à agitação durante 15 minutos a 250 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25). Após o resfriamento a água evaporada foi repostada até atingir o peso inicial e a amostra foi filtrada a vácuo. O filtrado obtido foi separado para determinação de Zn por espectrofotometria de absorção atômica no aparelho Varian-SpectrAA-200 (Embrapa, 1999).

3.4- Isolamento das leveduras

As amostras de mosto coletadas foram submetidas à diluição seriada em água estéril (1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000) e alíquotas de 250 µl foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri grandes contendo o meio YPD 2% e ampicilina. Foram isoladas aproximadamente 1000 colônias de leveduras de cada amostra coletada. Estas colônias foram transferidas por “replica plating” para placas contendo YPD e incubadas a 30° C por 48 horas.

3.5- Testes bioquímicos para identificação taxonômica das leveduras

As leveduras isoladas foram submetidas a testes bioquímicos de crescimento em diferentes fontes de carbono e de assimilação de nitrogênio. Após o crescimento em YPD 2% as leveduras foram transferidas por “replica plating” para meio Yeast Carbon Base (DIFCO Laboratories) contendo a fonte de nitrogênio a ser testada e meio YPD 2% para manutenção da cultura e incubadas a 30° C por 48 horas. As leveduras com características compatíveis com *Saccharomyces cerevisiae* de acordo com a metodologia desenvolvida por Vaughan-Martini e Martini (1983) foram selecionadas e submetidas aos demais testes de assimilação de fontes de carbono.

Para tanto, as leveduras foram inoculadas por “replica plating”, em placas de Petri contendo meio YP e a fonte de carbono a ser testada. As placas foram incubadas a 30° C por 48 horas e o crescimento foi observado. As leveduras que apresentaram crescimento de acordo com a chave de identificação para *Saccharomyces cerevisiae* foram submetidas aos demais testes.

3.6- Teste de floculação

Cepas de leveduras isoladas e selecionadas foram inoculadas em meio sólido YPD 2% e incubadas a 30° C por 48 horas. Cada levedura foi inoculada em um tubo contendo 4

ml de YP com 2% de glicose. Os tubos foram incubados a 28° C por 24 horas, sob agitação a 200 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25). Após esse período a floculação foi avaliada visualmente (Jin e Speers, 1998 e 2000; D'hautcourt e Smart, 1999; Verstrepen *et al.*, 2001).

3.7- Avaliação da produção de H₂S

Cepas de leveduras isoladas e selecionadas foram crescidas em agar YPD 2% a 30° C por 48 horas. Após o crescimento as leveduras foram inoculadas por “replica plating” em placas contendo o meio Bismuth Sulfite Agar (DIFCO Laboratories) e incubadas a 30° C durante 72 horas. As colônias de leveduras que apresentaram coloração negra após o tempo de incubação foram consideradas produtoras de H₂S (Jiranek *et al.*, 1995).

3.8- Testes de tolerância a diferentes tipos de estresse para as leveduras selecionadas

3.8.1- Teste de tolerância ao álcool

As leveduras foram inoculadas em meio sólido YPD 2% e incubadas a 30° C durante 48 horas. Após o crescimento as leveduras foram transferidas por “replica plating” para meio YPD 2% contendo etanol a 10%, 15% e 20%. As placas foram incubadas a 30° C durante 48 horas.

3.8.2- Tolerância à temperatura

As leveduras resistentes a maior concentração de etanol do teste anterior foram repicadas em placas de Petri contendo meio YPD 2% contendo a concentração de etanol tolerada. Em seguida as placas foram incubadas a 30° C e 37° C por 48 horas.

3.9- Teste de resistência a 5,5',5''-trifluoro-DL-leucina (TFL) e a Cerulenina

3.9.1- Teste de crescimento na presença de TFL

As leveduras foram crescidas em placas contendo YPD e incubadas a 30° C por 48 horas, em seguida elas foram transferidas por “replica plating” para placas de Petri contendo meio mínimo com glicose (2%) como fonte de carbono, suplementadas ainda com 1mM de TFL, e incubadas a 30° C por 72 horas. As leveduras foram avaliadas quanto à sensibilidade ou a resistência a TFL (Ashida *et al.*, 1987 e Casalone *et al.*, 1997).

3.9.2- Teste de crescimento na presença de cerulenina

As leveduras foram inoculadas em meio sólido YPD 2% e incubadas a 30° C durante 48 horas. Após o crescimento as leveduras foram transferidas por “replica plating” para meio mínimo contendo glicose 2% suplementada com 25 µM de cerulenina. As placas foram incubadas a 30° C por 72 horas. As leveduras que cresceram em tais condições foram consideradas resistentes a cerulenina. (Ichikawa *et al.*, 1991).

3.10- Determinação da atividade enzimática da invertase

3.10.1- Pré-inóculo e crescimento das leveduras

As leveduras foram inoculadas em meio sólido YPD 2% e incubadas a 30° C durante 48 horas. Após este período as leveduras foram inoculadas em 5 ml de meio YPD 4% e de meio YP Rafinose 2%, e crescidas durante 24 horas a 28° C, sob agitação (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25). O crescimento foi acompanhado medindo-se a densidade ótica (DO) à 600nm em espectrofotômetro (Beckman Model DU-68). O crescimento prosseguiu até a DO_{600 nm} atingir uma unidade (Salgado *et al.*, 2002).

3.10.2-Preparo de extratos celulares para determinação da atividade enzimática da invertase

Após o crescimento a cultura foi centrifugada durante 5 minutos, a 4° C, a 1.000g (Beckman GS-6R). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 3 ml de água destilada gelada. A amostra foi novamente centrifugada; o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspenso em 3 ml de tampão imidazol 200 mM (imidazol 200 mM, MgCl₂ 40 mM, KCl 400 mM, pH 7,0) e centrifugado nas mesmas condições. O procedimento anterior foi repetido duas vezes e o sobrenadante descartado. Após esta etapa adicionou-se 1 ml de tampão imidazol 50 mM (imidazol 50 mM, MgCl₂ 40 mM, KCl 400 mM, pH 7,0) e 0,5 g de perola de vidro em cada tubo. As células foram então rompidas por agitação em vortex (em intervalos de tempo de 60 segundos por três vezes) com repouso em gelo por 60 segundos após cada agitação. A amostra foi centrifugada a 1.000g por 5 minutos, a 4° C (Beckman GS-6R). O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf e centrifugado por 5 minutos a 12.000g (Heraeus Spatech, Biofuge 13). O sobrenadante foi recolhido em tubos de amostra do aparelho COBAS-FARA (Roche). O extrato livre de células foi estocado a temperatura de -20° C até o momento da dosagem da atividade invertásica (Salgado *et al.*, 2002).

3.10.3- Dosagem da invertase

A dosagem da enzima invertase foi realizada no aparelho de dosagens bioquímicas COBAS-FARA (Roche). Uma solução de sacarose 0,3 M em acetato de potássio 100 mM, pH 5,1 foi utilizada como substrato para a reação. Após 10 minutos de incubação a 30° C, a reação foi interrompida pela adição de NaOH 1M e em seguida adicionado igual volume de HCl 1 M para neutralizar o pH da reação. Após este procedimento a glicose liberada foi determinada pela reação de glicose-oxidase/peroxidase, tendo a ortodianisidina como reativo de cor e a leitura da absorbância foi feita a 546 nm (Goldstein e Lamén, 1975; Celenza e Carlson, 1989). A atividade da enzima invertase foi expressa em U. A. E.

(Unidade de atividade de enzima), sendo que 1 U. A. E. é definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolizar 1 nmol de substrato por minuto por mg de proteína.

3.11- Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína foi realizada segundo o método de Lowry *et al.* (1951), também adaptado às condições do aparelho de dosagens bioquímicas COBAS-FARA (Roche).

3.12- Teste de produção e de resistência a micocinas

As leveduras foram crescidas em placas contendo YPD e incubadas a 30° C por 48 horas. Após o crescimento as colônias de leveduras foram dissolvidas em 1ml de solução salina (0,9% de NaCl).

O meio YEPD-MB foi distribuído em placas de Petri. Após 24 horas, foram adicionados 100 µl de solução salina contendo a levedura *Cândida glabrata* NCYC 388 ou *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006, utilizadas como cepas sensíveis e produtoras de micocinas respectivamente, as quais foram homogeneizadas com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida foram aplicados 5 µl da levedura teste em pontos previamente identificados. As placas foram então incubadas a 25° C durante 7 dias para verificar a produção e a resistência ou sensibilidade a micocinas produzidas pelas cepas “killer” de referência. As cepas foram identificadas como produtoras de micocinas pela formação de um halo azul escuro de colônias mortas pela toxina produzida (Pataro *et al.*, 1998).

3.13- Identificação molecular das cepas

3.13.1- PCR - ITS (colônia)

Para amplificação da região do ITS (*internal transcribed spacer region*) que corresponde à região intergênica do DNA ribossomal de leveduras, foram utilizados os *primers* ITS1 (T CCG TAG GTG AAC CTG CGG) e ITS 4 (T CCT CCG CTT ATT GAT ATG C), como descrito por White *et al.* (1990). A reação de amplificação foi realizada com 3 µl do tampão 10X, 0,2 mM de dNTP, 20 pmol de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase em um volume final de 30 µl e 1 colônia como DNA template. As condições de amplificação foram uma desnaturação inicial a 94° C por 4 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 55° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto com uma extensão final a 72° C por 10 minutos.

3.13.2-Eletroforese em gel de agarose

O produto de PCR (6 µl) foi misturado com 1 µl de loading buffer (6X – azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e sacarose 40% p/v) e separado em gel de agarose 1,2% (w/v) com tampão TAE 1x (0,04 M TRIS, 1mM EDTA, pH 8,0 ajustado com ácido acético). Após a corrida eletroforética o gel foi corado com brometo de etídio (solução estoque 10 mg/ml) sob agitação por 10 a 30 minutos. Um marcador de 1KB DNA (Invitrogen) foi usado como padrão.

3.13.3- Purificação do produto de PCR

Um volume de 15 µl do produto de PCR diluído em 210 µl de TE (10 Mm Tris, 1mM EDTA, pH 8), foi acrescentado de 25 µl de acetato de sódio 3M pH 5,1 e 250 µl de PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, 25:24: 1), a mistura foi homogeneizada no vortex

e centrifugada a 12.000g por 2 min (Heraeus Spatech, Biofuge 13). Retirou-se aproximadamente 230 µl da fase superior, a qual foi transferida para um novo tubo eppendorf. Para precipitar o DNA adicionou-se 2 volumes de etanol 100% gelado. O tubo foi mantido a -70° C por 1 hora. Em seguida procedeu-se uma centrifugação a 12.000g por 15 minutos (Heraeus Spatech, Biofuge 13). O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a 68° C por 15 minutos e ressuspensão em 20 µl de água Milli-Q.

3.13.4- Digestão do fragmento de ITS

O fragmento de DNA resultante da purificação foi digerido com as enzimas de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*, como sugerido por Heras-Vasquez *et al.* (2002). Para cada reação de digestão foram utilizados 5 µl de DNA (0,3 ng), 1,5 µl de tampão de acordo com as instruções dos fabricantes, 0,5 µl de enzima e água estéril suficiente para um volume final de 15 µl por tubo. As amostras foram então colocadas em estufa a 37° C “overnight”.

3.13.5- Eletroforese em gel de acrilamida

A análise dos fragmentos resultantes da digestão foi conduzida em gel de acrilamida 6%, a 120 volts por aproximadamente 3 horas. Após a corrida o gel foi corado com prata passando por uma solução inicial de fixação (etanol 10% e ácido acético 0,5%) durante 3 minutos. Houve uma lavagem rápida com água, em seguida o gel foi deixado por 5 minutos na etapa de coloração (etanol 10%, ácido acético 0,5% e nitrato de prata 12 mM). Logo após procedeu-se nova lavagem com água durante 2 minutos. Por fim, foi utilizada a solução de desenvolvimento (NaOH 0,75 M e formaldeído 38%) até o aparecimento da cor. Um marcador de 1KB DNA (Invitrogen) foi utilizado como padrão.

3.14- Análise do Polimorfismo molecular das cepas

3.14.1-RAPD-PCR

3.14.1.1-Preparação do DNA genômico de leveduras

As leveduras foram crescidas em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio YPD 2%, a 28° C sob agitação de 200 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25) até a fase estacionária. A cultura foi centrifugada a 1.000g por 5 minutos e as células foram lavadas com 500 µl de água Milli-Q estéril. Após centrifugação a 6.000g por 5 minutos, as células foram ressuspensas em 300 µl de tampão de extração (sorbitol 1M, citrato de sódio 100mM, EDTA 60mM, pH 7) e foi acrescentado 20 µl de solução de liticase (0,3 mg/ml de liticase e 8 µl /ml de b-mercaptoetanol em tampão de extração). A suspensão foi agitada e incubada a 37° C por 3 horas. Após este período adicionou-se 400 µl de solução de lise (SDS 2% em Tris/HCl 50mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) e incubou-se a mistura por 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir adicionou-se 200 µl de NaCl 5M e após 2 horas no gelo, procedeu-se uma centrifugação a 12.000g por 10 min. O sedimento celular foi ressuspenso em 300 µl de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0). Em seguida prosseguiu-se a extração do DNA pela adição de 400 µl de PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, 25:24:1) e homogeneização em vortex por 2 minutos. Após este procedimento, a amostra foi novamente centrifugada a 12.000g por 5 minutos. A camada superior foi transferida para um novo tubo eppendorf previamente identificado, adicionando-se em seguida dois volumes de etanol PA para precipitação do DNA. O tubo foi então colocado por 5 minutos a -70° C. Em seguida procedeu-se nova centrifugação a 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado. Após a centrifugação o precipitado foi seco a 68° C durante 10 minutos e ressuspenso em 30 µl de água Milli-Q.

3.14.1.2-PCR

Para o ensaio do RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA), dois *primers* foram utilizados: EII (CTGGCTTGGTGTATGT) e LA1 (GCGACGGTGTACTAAC), como descrito por Barros Lopes *et al.* (1996). A reação foi procedida em um volume final de 50 µl, o qual continha 1 µl de DNA genômico (0,3 ng), 40 pmol de cada *primer*, 0,2mM de dNTP, 3 µl do tampão 10X e 2,5 U de Taq DNA polimerase. A amplificação passou por um passo inicial de desnaturação a 95° C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 44° C por 2 minutos e extensão a 72° C por 1,5 minutos. Depois do último ciclo houve uma extensão final a 72° C por 5 minutos.

3.14.1.3-Eletroforese em gel de acrilamida

A análise do produto de RAPD-PCR foi conduzida em gel de acrilamida 6%, a 120 volts por aproximadamente 5 horas. Após a corrida o gel foi corado com prata e escaneado. Um marcador de 1KB DNA (Invitrogen) foi usado como padrão.

3.14.2- COX-PCR

3.14.2.1-Preparação do DNA mitocondrial (DNAm_t) (extração e purificação)

As células foram inoculadas em 5 ml de meio YPD 2% e incubadas até a fase estacionária, a 28° C, sob agitação de 200 rpm em incubador New Brunswick Model G25. A cultura foi centrifugada por 5 minutos a 1.000g, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1000 µl de água milli-Q estéril. A amostra foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada a 5.000g por 5 minutos (Haeraeus Sepatech, Biofuge 13). O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento celular ressuspenso em 500 µl de Sorbitol 1M, EDTA 0,1M, pH 7, 5, com adição de 20 µl de solução de liticase (0,3 mg/ml

de liticase e 8 µl /ml de β-mercaptoetanol em tampão de extração). Os tubos foram então incubados a 37° C por 3 horas e a formação dos esferoplastos foi monitorada opticamente em um microscópio. Os esferoplastos foram centrifugados a 5.000g por 5 minutos e o precipitado ressuspenso em 500 µl de 50 mM Tris-HCl - 20 mM EDTA, pH 7,4. Em seguida foram adicionados 13 µl de SDS (Duodecil Sulfato de Sódio) 10%, e a mistura incubada a 65° C por 15 minutos. Imediatamente depois foram adicionados 200 µl de acetato de potássio 1M, os tubos foram colocados no gelo por 5 minutos e subsequentemente centrifugados a 10.000g por 15 minutos (Haeraeus Sepatech, Biofuge 13) e colocados à temperatura de -20° C por 5 minutos, este procedimento foi repetido três vezes. O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf novo e o DNA foi precipitado pela adição de um volume de isopropanol. Depois de incubados a temperatura ambiente por 10 minutos, os tubos foram centrifugados a 10.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNAm_t lavado com etanol 70%. Procedeu-se nova centrifugação a 10.000g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA seco a 68° C durante 10 minutos. Após este procedimento o DNA foi ressuspenso em 30 µl de água milli-Q estéril (Querol *et al.*, 1992b).

3.14.2.2-PCR

O gene mitocondrial *COXI* que codifica a subunidade 1 da citocromo oxidase foi utilizado para análise devido à variação no número e posição de seus introns (López *et al.*, 2003). Os introns do *COXI* foram amplificados por PCR utilizando os *primers* 3L (GCTTTAATTGGWGGWTTTGG), 3R (ATTGTCATACCATTTGTCTYCTYAT), 4L (GAAGTAGCAGGWGGWGGWGA) e 5R (GTTAGCTAAGGCWACWCCWGT). O DNA foi amplificado em um termociclador (Eppendorf-Mastercycler). A reação de amplificação continha 50 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP, 5 µl do tampão 10X, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 5 µl de DNAm_t (0,3 ng), em um volume final de 50 µl. Os parâmetros de amplificação utilizados foram uma desnaturação inicial a 95° C por 4

minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto; anelamento a 51° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 2 minutos, com extensão final a 72° C por 5 minutos.

3.14.2.3-Eletroforese em gel de acrilamida

O produto de PCR foi separado em gel de acrilamida 6%, a 120 volts por aproximadamente 5 horas. Após a corrida o gel foi corado com prata como descrito anteriormente. Um marcador de 1KB DNA (Invitrogen) foi usado como padrão.

3.14.3- Cariotipagem

As células de levedura foram cultivadas em 5ml de meio YPD por 24 horas a 28° C, 160 rpm. O DNA cromossomal foi isolado como descrito por Lopez *et al.* (2001), lavado em tampão TE (EDTA 1Mm, Tris-HCL 10Mm, pH 8,0) a 50° C durante 30 minutos e então lavado novamente três vezes com o mesmo tampão a temperatura ambiente por 30 minutos. Os DNAs foram colocadas em um gel de agarose (Seakem® Gold) 1% (w/v) e a corrida foi conduzida usando um sistema TAFE (transverse alternating field electrophoresis) Geneline, Beckman. As condições utilizadas foram as seguintes: voltagem constante de 250 V por 6 horas com 35 s pulso de tempo, seguido por 20 h a 275 V com 55 s pulso de tempo a temperatura constante de 14° C (Schüller *et al.*, 2004). O tampão utilizado na corrida eletroforética era composto por Tris base 10mM, EDTA 0,5mM e ácido acético 4 mM. O gel foi então corado com brometo de etídio, visualizado e fotografado. Este experimento foi realizado na Universidade do Minho em Braga, Portugal pelas doutoras Dorit Schuller e Margarida Casal.

3.15- Parâmetros fermentativos

3.15.1-Determinação da curva de crescimento das leveduras selecionadas

3.15.1.1-Preparo do inóculo

As leveduras foram crescidas em placas de Petri contendo meio YPD 2% durante 48 horas a 30° C. Após este período as leveduras foram inoculadas em 5 ml de meio YPD 2% e incubadas a 28° C durante a noite, sob agitação a 200 rpm (Incubador rotatório New Brunswick Model G25). Depois de aproximadamente 16h de crescimento, 1 ml da pré-cultura foi utilizada para inocular 100 ml de YPD 2%. Esta segunda pré-cultura foi crescida a 28° C até a fase de crescimento logarítmica com DO_{600nm} igual a 1. O meio foi então centrifugado a 1.000g por 5 minutos, a 4° C (Beckman GS-6R), as células foram lavadas com água estéril e utilizadas para inocular 100 ml de meio YP contendo 16% de sacarose com posterior incubação a 28° C por 36 horas sob agitação a 200 rpm (Vestrepn *et al.*, 2003a).

3.15.1.2-Determinação da curva de crescimento

A cada intervalo de 3 horas, coletou-se uma alíquota de 50 µl das amostras em estudo, procedendo-se à diluição com 950 µl de meio YP 16% sacarose para efetuar a medida da densidade ótica a 600nm em espectrofotômetro (Beckman Model DU-68).

3.15.2-Determinação do consumo sacarose

Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante da cultura anterior (item 3.15.1.1) foi transferido para um tubo eppendorf, previamente identificado. A amostra foi diluída 100 vezes com água milli-Q e a determinação da concentração de sacarose foi realizada no aparelho COBAS-FARA (Roche). As amostras contendo sacarose foram submetidas à

análise utilizando-se os reagentes provenientes do “kit” utilizado para ensaios enzimáticos de Maltose / Sacarose e D-Glicose (Enzymatic BioAnalysis / Food Analysis-Boehringer mannheim/R.Biopharm) método-UV. Os resultados obtidos em termos de absorbância resultaram na determinação da concentração de sacarose em g/l.

3.15.3- Determinação de etanol

As dosagens de etanol foram realizadas no aparelho de dosagens bioquímicas COBAS-FARA (Roche). Foi utilizada uma pequena alíquota do sobrenadante da cultura anterior (item 15.1.1), a qual foi diluída 100 vezes com água milli-Q. Os reagentes utilizados foram provenientes do “kit” utilizado para ensaios enzimáticos de Etanol (Enzymatic BioAnalysis / Food Analysis-Boehringer mannheim / R.Biopharm) método-UV. Uma vez obtido os resultados em termos de absorbância, o cálculo da concentração de etanol foi efetuado e o etanol assim determinado foi expresso em porcentagem.

3.15.4- Determinação de álcoois e ésteres

3.15.4.1-Preparo das amostras fermentadas

Nos tempos 0, 12, 24 e 36 horas, foram coletadas assepticamente alíquotas de 10 ml das amostras do meio de crescimento celular e transferidas para tubos cônicos de polietileno de 50 ml, previamente identificados. Após centrifugação por 5 minutos a 4° C, 1.000g, as células foram descartadas e o sobrenadante destilado por arraste de vapor em um microdestilador. Para determinação de álcoois e ésteres nas amostras, foi tomada uma alíquota de 2,0 ml do destilado e 1 µl do Padrão Interno, esta solução foi então analisada em triplicata por cromatografia gasosa (Nonato *et al.*, 2001; Boscolo *et al.*, 2000).

3.15.4.2-Preparo das amostras de cachaça

Para determinação de álcoois e ésteres nas cachaças, as amostras foram retiradas de garrafas fornecidas pelos produtores e abertas no momento da análise. Foi então tomada uma alíquota de 2 ml de cachaça e 1 µl de Padrão Interno, esta solução foi analisada por cromatografia gasosa (Nonato *et al.*, 2001; Boscolo *et al.*, 2000).

3.15.4.3-Reagentes e padrões

Foram utilizados os seguintes reagentes padrões de fabricação Merck: 1-hexanol (grau HPLC), acetato de isoamila (grau HPLC), propanol (grau HPLC), álcool isoamílico (grau PA), etanol (grau PA), acetato de etila (grau PA) e butanol (grau PA). Também se utilizou os seguintes padrões de fabricação Sigma: ácido capróico (grau HPLC) e caproato de etila (grau HPLC). Foi utilizada água do sistema de purificação milli-Q.

3.15.4.4-Condições cromatográficas

Para a determinação dos ésteres e dos álcoois presentes nas amostras, utilizou-se a técnica de cromatografia gasosa (GC). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás Varian, mod. CP 3380, com detector de ionização em chama (FID) e injetor com modo *split/splitless*. Para a separação dos componentes da mistura utilizou-se uma coluna cromatográfica de 30 m com 0,25 mm de diâmetro interno e como fase estacionária, 0,5 µm de espessura de filme de polietileno glicol (DB-WAX). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor igual a 225° C, temperatura do detector igual a 280° C, vazão dos gases no detector igual a 30 ml/min para o hidrogênio e 300 ml/min para o ar sintético; a velocidade linear da fase móvel foi igual a 42 cm/s utilizando-se divisão de fluxo (*split*) numa razão de 1:30; a programação de temperatura do forno da coluna durante a análise cromatográfica foi igual a 30° C por 5 minutos, em seguida a temperatura foi elevada a 180° C a uma razão de 10° C por minuto, então, mantida por 4 minutos a esta

temperatura e finalmente, a temperatura foi elevada a 250° C a uma razão de 50° C por minuto, quando então, a coluna permaneceu nesta temperatura por mais 5 minutos. Dessa forma o tempo total para a eluição da amostra foi igual a 30 minutos. Foram feitas injeções de 1,0 µl, em triplicata, do destilado e das amostras de cachaça descritas anteriormente.

3.15.4.5- Procedimento para identificação e quantificação dos álcoois e ésteres

Os compostos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões. Inicialmente os padrões foram injetados separadamente para determinar o tempo de retenção e o grau de pureza. A quantificação dos compostos nas amostras foi realizada pelo método de padronização interna utilizando o 1-hexanol como padrão interno. Foram construídas curvas de calibração plotando-se a razão da área do composto padrão e a área do padrão interno versus a concentração daquele, para os seguintes compostos: álcool isoamílico, acetato de isoamila, acetato de etila, n-propanol, álcool isobutílico, ácido capríco e caproato de etila. As soluções padrões foram preparadas pela adição de 1 µl, 3 µl, 5 µl e 10 µl de cada padrão em balões volumétricos de 10 ml acrescidos de 5 ml de etanol e 5 µl de 1-hexanol, o volume final foi acertado com água milli-Q. As soluções padrões preparadas dessa forma continham em torno de 100 mg/l; 200 mg/l; 400 mg/l e 800 mg/l de cada padrão.

3.16- *Northern Blot*

3.16.1-Extração e preparação do RNA

As células de levedura foram crescidas em meio YP sacarose 16%, como descrito no item 3.15.1.1 e nos tempos 0, 12, 24 e 36 horas, foram coletadas assepticamente alíquotas de 10 ml das amostras do meio de crescimento celular e transferidas para tubos

cônicos de polietileno de 50 ml, previamente identificados. Após centrifugação por 5 minutos a 4° C, 1.000g, o sobrenadante foi descartado e as células foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a – 80° C. As células foram então ressuspensas em 600 µl de solução TES (Tris-HCl 10Mm, EDTA 10Mm, SDS 0,5%, pH 7,5). Foram adicionados aos tubos 1 volume de fenol ácido e a solução foi homogeneizada vigorosamente em vortex por 10 segundos. A mistura foi incubada a 65° C durante 60 minutos, em seguida procedeu-se agitação leve em vortex durante 10 minutos. Após esta etapa os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 1.000g e o sobrenadante obtido foi transferido para tubos eppendorf de 1,5 ml, ao qual foram adicionados 600 µl de clorofórmio. As amostras foram novamente agitadas vigorosamente no vortex e centrifugadas a 1.000g por 5 minutos a 4° C. Novamente a fase aquosa obtida foi transferida para novos tubos eppendorf, com adição de 40 µl de Acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 2 volumes de etanol 100%, gelado. A mistura foi então centrifugada durante 5 minutos a 1.000g a 4° C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado, procedeu-se homogeneização rápida e centrifugação a 1.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras de RNAs foram ressuspensas em 80 µl de H₂O milli-Q DEPC (dietilpirocarbonato) e estocados a – 80° C.

3.16.2- Eletroforese de RNA

As amostras de RNA extraídas das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (procedimento descrito no item anterior) foram submetidos à desnaturação a 68° C por 5 minutos, com posterior adição de tampão de amostra para RNA (1 volume de NBC 20X (Ácido Bórico 1 M; Citrato de sódio 20Mm e NaOH 100Mm, ph 7,5), 3 volumes de formaldeído 37%, 10 volumes de formamida e 2 volumes de loading dye (15% de ficoll, Na₂EDTA 0,1M ph 8,0, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xilenocianol)) e brometo de etídio. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% contendo formaldeído 2,2 M e NBC 1X como tampão de corrida. Após 3 horas de corrida a 70 volts, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta pelo sistema SONY.

3.16.3- Preparo da sonda

O gene *ATFI* foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa do Doutor Johan Thevelein da Universidade Católica de Leuven, Bélgica. A amostra foi submetida a corte com enzima de restrição *XhoI* para separação do gene de interesse do plasmídeo. Em seguida a amostra foi aplicada em gel de agarose para eletroforese, após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio e revelado com luz ultravioleta pelo sistema SONY. Em seguida o papel Whatman DE 81 foi introduzido abaixo da banda de interesse e novamente foi introduzida uma corrente de 100V, por cerca de 20 minutos, tempo para a completa transferência do DNA para o papel. O DNA foi então eluído pela adição de 500 µl de TE (Tris 1 M e EDTA 0,5 M) contendo NaCl 1 M, ao fragmento de papel Whatman DE 81. A mistura foi homogeneizada em vortex e incubada durante a noite à temperatura ambiente. Após o período de incubação o tubo foi centrifugado a 1.000g (Heraeus Sepatech, Biofuge 13), por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf para posterior purificação. A amostra foi então levada ao vortex para agitação e após a adição de 500 µl de PCI foi centrifugada por 5 minutos a 1.000g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e 1 volume de clorofórmio foi adicionado, em seguida a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 4° C, por 5 minutos, na rotação máxima. O DNA presente na fase aquosa foi precipitado pela adição de 0,6 volumes de isopropanol, por 5 minutos a – 20° C. A amostra foi então centrifugada durante 15 minutos a 1.000g a 4° C e após ter sido descartado o sobrenadante, o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado (500 µl) e centrifugado a 4° C por 5 minutos a 1.000g. O sobrenadante foi desprezado e, após secagem a 65° C por 10 minutos, o DNA foi ressuspensão em 30 µl de água milli-Q estéril.

3.16.4- Preparo da sonda radioativa

O DNA do gene *ATFI*, produto da purificação descrita no item anterior, foi desnaturado a 95° C por 5 minutos, em banho Maria, e resfriado em gelo por 5 minutos. O DNA foi brevemente centrifugado e adicionado ao tubo de reação da Rediprime II Random

Prime Labelling System (Amersham) que contem os desoxinucleotídeos (dATP, dGTP e dTTP); Klenow fragmento da DNA polimerase e oligonucleotídeos randômicos. Após terem sido acrescentados ao tubo 5 µl de [α - P^{32}] – dCTP, a reação foi incubada a 37° C por 2 horas quando então foi interrompida pela adição de 5 µl de EDTA 0,2 M. Para ser usado na hibridação o DNA marcado foi desnaturado a 95° C e resfriado por 5 minutos no gelo.

3.16.5-Northern Blot e Hibridação com sonda radioativa

O gel de eletroforese contendo os RNAs como descrito no ítem 3.16.2 foi tratado com uma solução de NaOH 50 mM por 30 minutos, lavado com água e incubado com uma solução Tris-HCl pH 7.5, 0,15 M de NaCl, por 30 minutos. O gel foi lavado novamente com água e transferido, durante 3 horas, para uma membrana de nitrocelulose de 13 X 11,5 cm (Amersham/ Hybond – N) previamente embebida em tampão SSC 10X (NaCl 1,5 M; citrato de sódio 0,15 M, pH 7.0). A transferência foi realizada por pressão utilizando-se a solução SSC 10X e papel de filtro. O RNA transferido para a membrana foi fixado por “crosslinking” com luz ultravioleta (CROSSLINK Biorad, Program: 50mJoules) por 150 segundos. A membrana foi tratada com solução de pré – hibridação (Na₂HPO₄ pH 7.2 - 0,12M; NaCl 0,25 M; EDTA 1 mM; formamida 50%; SDS 7%) por 2 horas a 65° C. Após este tempo, a solução de pré – hibridação foi descartada e adicionou-se 20 ml da mesma solução juntamente com a sonda radioativa que foi preparada pelo procedimento do ítem 3.8.4. A mistura foi incubada por 2 horas a 68° C. A membrana foi então lavada com: SSC 1,0x, SDS 0,1% por 30 minutos a 68° C; SSC 0,5x, SDS 0,1% por 30 minutos a 68° C e SSC 1,0x, SDS 0,1% por 30 minutos a 68° C. Logo após a lavagem, a membrana foi seca à temperatura ambiente e exposta a um filme de raios-X por um período de 3 dias. Em seguida o filme foi revelado por 4 minutos (GBX – Kodak) e fixado por 5 minutos (GBX – Kodak).

3.17- Reprodutividade dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para todos os resultados obtidos foram computados os valores médios com seus respectivos desvios-padrão, conforme mostram as Tabelas e Figuras.

RESULTADOS

4- Resultados

4.1- Isolamento e identificação das leveduras

Foram coletadas amostras de mosto em quatro destilarias diferentes, duas no Sul / Sudeste de Minas e duas do Norte de Minas / Jequitinhonha. As amostras coletadas como descrito no item 3.1 de material e métodos foram inoculadas em meio YPD 2% adicionado de ampicilina 100 µg/ml. Após o crescimento a 30° C por 48 horas foram obtidas proximadamente 1.000 colônias de leveduras de cada cachaçaria. As colônias obtidas foram submetidas a testes de identificação bioquímica de crescimento em diferentes fontes de carbono e de assimilação de nitrogênio como descrito por Vaughan-Martini e Martini (1983).

Inicialmente, as colônias de leveduras foram testadas para a capacidade de assimilação de fontes de nitrogênio como lisina e etilamina para eliminação de leveduras identificáveis como de outras espécies, ainda que a espécie *S. cerevisiae*, seja predominante nos processos fermentativos de produção de cachaça (Morais *et al.*, 1997 e Pataro *et al.*, 2000). Confirmando esta tendência, os resultados mostrados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 demonstram que o número de colônias excluídas nesta etapa foi muito pequeno, sendo que algumas colônias foram eliminadas devido à contaminação por fungos e bactérias.

Para viabilização dos experimentos, foram selecionadas aproximadamente 650 colônias de leveduras de cada destilaria para serem submetidas à capacidade de crescimento em diversas fontes de carbono. Foram selecionadas as fontes de carbono que promovem a exclusão de um maior número de leveduras de espécies diferentes de *S. cerevisiae*. Nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 observa-se também o número de leveduras excluídas para cada fonte de carbono testada. As leveduras com características bioquímicas compatíveis com a espécie *S. cerevisiae* foram selecionadas para estudos posteriores e as demais eliminadas.

Tabela 1- Seleção de cepas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* a partir de testes de assimilação de fonte de nitrogênio e carbono conforme descrito por Vaughan-Martini e Martini (1983) para a cachaçaria A.

Cachaçaria A		Nº de cepas testadas	Nº de cepas excluídas	Comportamento esperado
Fonte de nitrogênio	Lisina	1074	2	N
	Etilamina	1072	-	N
Fonte de carbono	Manitol	690	1	N
	Lactose	689	-	N
	Glicerol	689	47	P
	Etanol	642	40	P
	Sacarose	602	-	P
	Galactose	602	-	P
	Maltose	602	-	P
	Rafinose	602	16	P
Total de cepas excluídas			106	
Nº final de cepas		586		

N- não assimila a fonte de nitrogênio ou carbono

P- assimila a fonte de nitrogênio ou carbono

Tabela 2- Seleção de cepas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* a partir de testes de assimilação de fonte de nitrogênio e carbono conforme descrito por Vaughan-Martini e Martini (1983) para a cachaçaria B.

Cachaçaria B		Nº de cepas testadas	Nº de cepas excluídas	Comportamento esperado
Fonte de nitrogênio	Lisina	1093	1	N
	Etilamina	1092	-	N
Fonte de carbono	Manitol	680	-	N
	Lactose	680	-	N
	Glicerol	680	170	P
	Etanol	510	2	P
	Sacarose	508	-	P
	Galactose	508	-	P
	Maltose	508	-	P
	Rafinose	508	8	P
Total de cepas excluídas			181	
Nº final de cepas		500		

N- não assimila a fonte de nitrogênio ou carbono

P- assimila a fonte de nitrogênio ou carbono

Tabela 3- Seleção de cepas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* a partir de testes de assimilação de fonte de nitrogênio e carbono conforme descrito por Vaughan-Martini e Martini (1983) para a cachaçaria C.

Cachaçaria C		Nº de cepas testadas	Nº de cepas excluídas	Comportamento esperado
Fonte de nitrogênio	Lisina	1048	-	N
	Etilamina	1048	-	N
Fonte de carbono	Manitol	640	-	N
	Lactose	640	-	N
	Glicerol	640	273	P
	Etanol	367	3	P
	Sacarose	364	-	P
	Galactose	364	-	P
	Maltose	364	1	P
	Rafinose	363	28	P
Total de cepas excluídas			305	
Nº final de cepas		335		

N- não assimila a fonte de nitrogênio ou carbono

P- assimila a fonte de nitrogênio ou carbono

Tabela 4- Seleção de cepas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* a partir de testes de assimilação de fonte de nitrogênio e carbono conforme descrito por Vaughan-Martini e Martini (1983) para a cachaçaria D.

Cachaçaria D		Nº de cepas testadas	Nº de cepas excluídas	Comportamento esperado
Fonte de nitrogênio	Lisina	1055	-	N
	Etilamina	1055	-	N
Fonte de carbono	Manitol	625	-	N
	Lactose	625	-	N
	Glicerol	625	30	P
	Etanol	595	35	P
	Sacarose	560	-	P
	Galactose	560	-	P
	Maltose	560	-	P
	Rafinose	560	49	P
Total de cepas excluídas			114	
Nº final de cepas		511		

N- não assimila a fonte de nitrogênio ou carbono

P- assimila a fonte de nitrogênio ou carbono

4.2- Outros critérios de seleção

4.2.1- Produção de H₂S

As cepas de leveduras identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* foram submetidas ao teste de produção de H₂S, sendo que apenas uma cepa positiva da cachaçaria B foi encontrada entre todas as cepas testadas. As leveduras produtoras deste composto são indesejáveis para o processo fermentativo já que o H₂S agrega odor e sabor desagradáveis às bebidas (Ribeiro e Horii, 1999); por isto, cepas com esta característica foram excluídas do grupo.

4.2.2- Tolerância a etanol e a temperaturas elevadas

A fermentação do caldo de cana para produção de cachaça pode ocorrer em temperaturas elevadas e conduzir a altas concentrações de etanol, estas características podem determinar a diversidade observada de cepas *S. cerevisiae* prevalentes na produção da bebida (Pataro *et al.*, 2000). Assim, condições específicas de temperatura e de concentração de etanol podem ser usadas como critério de seleção de cepas indígenas.

Deste modo, com o intuito de selecionar cepas de *S. cerevisiae* mais resistentes a estes fatores estressantes, avaliamos o fenótipo de 140 cepas de leveduras de cada cachaçaria submetidas ao teste de crescimento na presença de diferentes concentrações de etanol: 10%, 15% e 20%, à temperatura de 30° C. Todas as cepas apresentaram crescimento satisfatório nas concentrações de 10% e 15% de etanol, sendo que na concentração de 20% não houve crescimento celular.

As cepas de leveduras foram então submetidas ao teste de tolerância a diferentes temperaturas. Para tanto, as leveduras foram inoculadas em meio YP acrescido de etanol 15% e submetidas ao crescimento à temperatura de 30° C e 37° C. As leveduras se adaptaram bem às duas temperaturas não havendo exclusão de nenhuma cepa.

A possibilidade de crescimento a 37° C e em uma relativa elevada concentração de etanol simula as condições das dornas de fermentação, o que comprova que a maioria das cepas é fisiologicamente adaptada a estas condições (Pataro *et al.*, 2000).

4.2.3- Seleção de cepas resistentes a TFL e Cerulenina:

Na busca pela seleção de cepas de leveduras produtores de compostos que conferem sabor e aroma diferenciados a cachaça, drogas como TFL e cerulenina têm sido utilizadas. Cepas resistentes a TFL não apresentam retroinibição da α -IPM por L-leucina o que possibilita o acúmulo de álcool isoamílico e segundo Yoshizawa (1999), cepas com a enzima ácido graxo sintetase resistente a cerulenina apresentam uma maior capacidade de formar e acumular ácido caprótico, um precursor do caproato de etila.

De início, as cepas foram expostas a TFL para seleção das cepas resistentes a este composto. Do grupo de cepas analisadas, cerca de 58% das leveduras da cachaçaria C são naturalmente resistentes a este análogo de leucina (Tabela 5); já nas cachaçarias A, B e D as cepas apresentaram um perfil de resistência de 27%, 29% e 48%, respectivamente.

As leveduras foram também expostas a cerulenina para verificar a resistência a esta droga. As leveduras apresentaram cerca de 80% de resistência na cachaçaria D e nas demais cachaçarias cerca de 90% (Tabela 5).

Ao final do teste foram obtidas cepas de leveduras resistentes a ambos compostos, as quais perfizeram um total de 115 cepas correspondendo a 20,5% do total de cepas analisadas. Entre as cachaçarias, podemos observar que a C foi a que apresentou maior número de cepas resistentes a ambos os compostos as quais correspondem à cerca de 53% das cepas analisadas nesta cachaçaria. As demais cachaçarias A, B e D apresentaram respectivamente cerca de 26%, 28% e 37 % de resistência a ambos os compostos.

Tabela 5: Teste de resistência a TFL e cerulenina em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cachaçaria	Nº de cepas expostas	Resistência	Nº de cepas resistentes	% de resistência
A	140	TFL	38	27,14%
		Cerulenina	133	95,00%
		TFL e Cerulenina	36	26,27%
B	140	TFL	41	29,28%
		Cerulenina	129	92,14%
		TFL e Cerulenina	40	28,57%
C	140	TFL	85	58,57%
		Cerulenina	135	96,42%
		TFL e Cerulenina	70	53,43%
D	140	TFL	67	47,85%
		Cerulenina	114	81,42%
		TFL e Cerulenina	45	37,19%
Total de cepas resistentes a TFL e Cerulenina			115	
% total de resistência a TFL e Cerulenina				20,53%

4.2.4- Dosagem de invertase

Dentre as 115 cepas de leveduras resistentes a TFL e Cerulenina foram escolhidas aleatoriamente 6 cepas de cada cachaçaria, as quais foram submetidas ao teste de dosagem da atividade da enzima invertase. A enzima invertase em *S. cerevisiae* é codificada pelo gene *SUC2* e catalisa a quebra da sacarose em frutose e glicose. Como a sacarose é o principal açúcar presente no caldo de cana, a dosagem desta enzima é uma das formas de verificar a capacidade fermentativa da levedura (Ekunsanmi e Odunfa, 1990; Pataro *et al.*, 1998).

Na Figura 3 podemos observar o resultado da atividade invertásica do conjunto de cepas analisadas. Como demonstrado, as cepas apresentaram uma alta atividade, maior que 5.000 U.A.E., quando o substrato de crescimento foi a rafinose e baixa atividade, quase indetectável em alguns casos, quando as células foram crescidas em glicose.

As cepas de leveduras com atividade invertásica superior a 10.000 U.A.E. foram consideradas com maior capacidade fermentativa, sendo que apenas três cepas permaneceram abaixo deste valor. Deste modo, foram selecionadas 21 cepas de leveduras com uma potencialmente alta capacidade fermentativa.

4.2.5- Flocculação

As leveduras com características flocculantes são de grande interesse na produção de bebidas devido a fatores operacionais e econômicos (Vestrepen *et al.*, 2001 e 2003c). Assim, as 21 cepas de leveduras selecionadas anteriormente, seis da cachaçaria C e cinco de cada uma das cachaçarias A, B e D, foram submetidas ao teste de flocculação espontânea na presença de 2% de glicose (como descrito no ítem 3.6 de material e métodos).

Das leveduras analisadas podemos observar que as pertencentes a cachaçaria A e C apresentaram um perfil de flocculação variável, como mostrado na Tabela 6. Já as cepas de leveduras do grupo B demonstraram ser não flocculantes e as do grupo D totalmente

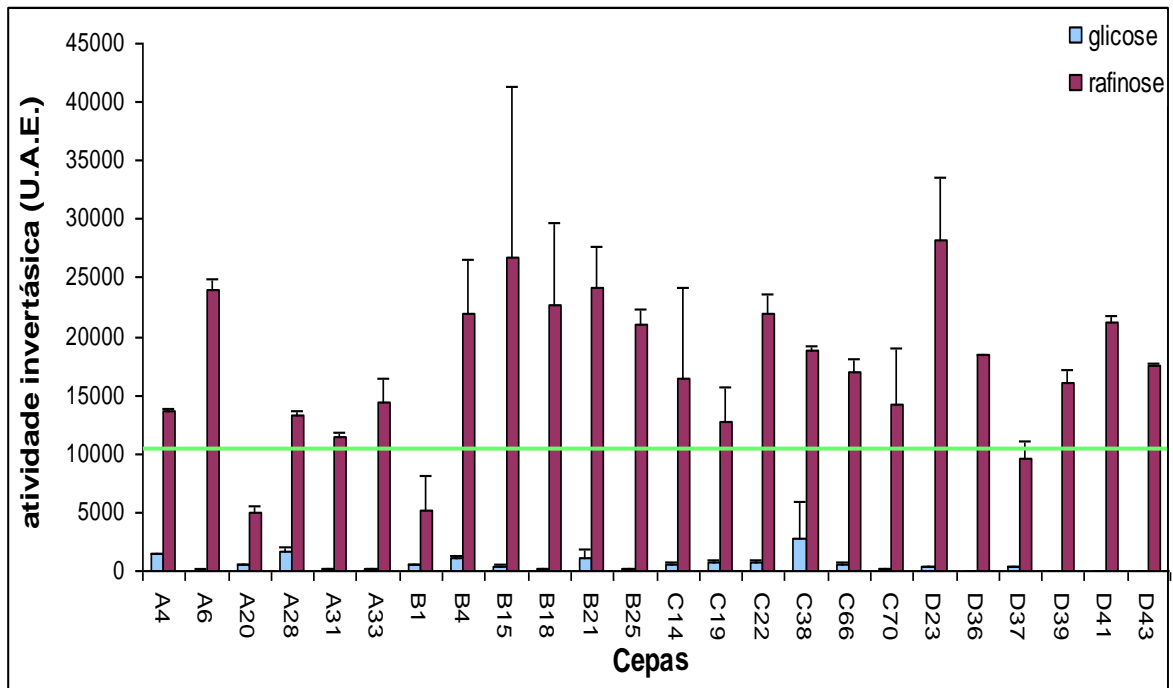


Figura 3: Atividade invertásica das 24 leveduras selecionadas. A Figura apresenta o resultado da dosagem da atividade invertásica na presença de glicose e rafinose.

Tabela 6- Resultado do teste de floculação em YP 2% de glicose.

CEPA	Floculação	CEPA	Floculação
A4	+	C14	+
A6	+	C19	-
A28	+	C22	+
A31	+	C38	+
A33	-	C66	+
B4	-	C70	-
B15	-	D23	+
B18	-	D36	+
B21	-	D39	+
B25	-	D41	+
		D43	+

OBS: Os sinais + correspondem à floculação positiva.

Os sinais – correspondem à ausência de floculação nas condições testadas.

As cepas em negrito foram as selecionadas para prosseguir os experimentos.

floculantes dentro da condição analisada. Assim, foram obtidas 13 cepas de leveduras floculantes (61,9%) e 8 cepas não floculantes (38,1%).

A partir deste teste foi escolhida uma cepa de cada cachaçaria para prosseguir nos estudos posteriores. As cepas selecionadas foram de preferência cepas com características floculantes, porém, na cachaçaria B, como nenhuma levedura apresentou esta característica foi selecionada uma levedura não floculante. As cepas selecionadas foram designadas A4, B21, C22 e D23.

4.2.6- Produção de micocinas

Uma importante característica do processo fermentativo espontâneo é a presença de leveduras do tipo “killer” (Van Vuuren e Jacobs, 1992; Pataro *et al.*, 1998). As cepas de leveduras produtoras de micocinas caracterizam-se pela capacidade de eliminar linhagens contaminantes sensíveis as micocinas, e em vinhos, foi observado que estas cepas podem dominar o final do processo fermentativo (Cansado *et al.*, 1991; Longo *et al.*, 1992). Sendo assim, as cepas de leveduras A4, B21, C22 e D23 foram submetidas ao teste de produção de micocinas.

Quando as cepas foram testadas contra as linhagens *Cândida glabrata* NCYC 388 e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006, foi observado que todas foram produtoras de micocinas e também resistentes a micocinas produzidas. Este resultado foi verificado pela formação de um halo azul escuro de colônias mortas pela toxina produzida (resultado não mostrado).

4.2.7- Identificação molecular de leveduras

Na identificação molecular de leveduras, a amplificação da região de ITS (*internal transcribed spacer region*) tem sido adequada para discriminação entre espécies (Mitterdorfer *et al.*, 2002; Pramateftaki *et al.*, 2000). Assim sendo, foram realizadas reações de PCR da região ITS utilizando os *primers* ITS1 e ITS4, permitindo a amplificação de

uma simples banda característica de 850 pb (White *et al.*, 1990). Para realização do experimento foram utilizadas colônias das quatro cepas escolhidas anteriormente (A4, B21, C22 e D23), duas cepas pertencentes à coleção do laboratório (LBCM 422 e LBCM 427), também isoladas de uma cachaçaria (Vicente *et al.*, 2005) e quatro outras cepas usadas como padrão: uma cepa de laboratório W303 (*Saccharomyces cerevisiae*), *Saccharomyces boulardii* (*S.b*), *Saccharomyces paradoxus* (*S.p*) e *Saccharomyces kluyveri* (*S.k*).

O produto de amplificação apresentou um fragmento de aproximadamente 850 pb para as cepas de *S. cerevisiae* o qual é característico da espécie (White *et al.*, 1990). Foi obtido o mesmo resultado para a espécie *S. paradoxus* (*S.p*), a qual pertence ao grupo *sensu stricto* juntamente com a espécie *S. cerevisiae* (Valente *et al.*, 1996). A espécie *S. boulardii* também apresentou o mesmo resultado, confirmando os 95% de similaridade com a espécie *S. cerevisiae* (Vaughan-Martini e Martini, 1998) A espécie *S. kluyveri* foi a única que apresentou fragmento de tamanho diferente (Figura 4).

Para confirmação de que as cepas A4, B21, C22 e D23 eram realmente *S. cerevisiae*, o produto de amplificação do ITS foi submetido a corte com as endonucleases de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*. O perfil obtido pela digestão do produto de amplificação com *CfoI* resultou em quatro bandas, as quais apresentaram um fragmento de 10 pb (dado não mostrado), e os demais com 135, 363 e 372 pb respectivamente (Figura 5); foram obtidos também quatro fragmentos de restrição resultantes da digestão com *HaeIII*, cujos tamanhos variaram entre 129 a 311 pb (Figura 6); por fim a digestão com a endonuclease *HinfI* gerou três fragmentos de 117, 362 e 393 pb (Figura 7).

Os fragmentos obtidos pela digestão com as endonucleases de restrição está em acordo com o mapa de restrição para a região ITS1 - ITS4 de *S. cerevisiae* (<http://db.yeastgenome.org>). Como demonstrado, o perfil de restrição resultante da digestão foi idêntico ao obtido para *S. cerevisiae* (W303), confirmando que as cepas isoladas são da espécie *S. cerevisiae*.

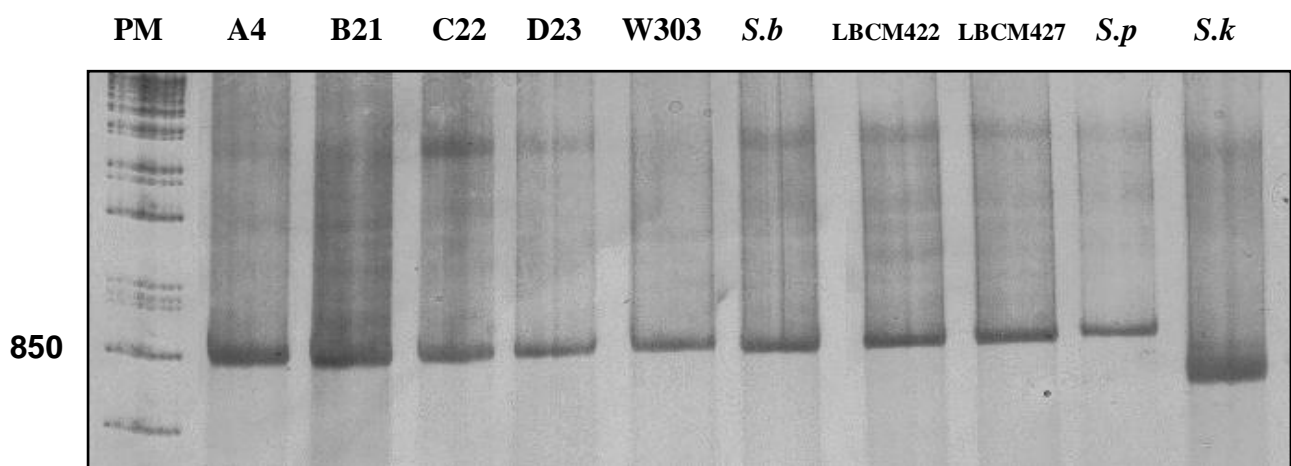


Figura 4. Gel de agarose corado com prata mostrando o fragmento de ITS, amplificado a partir dos *primers* ITS1 e ITS4. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

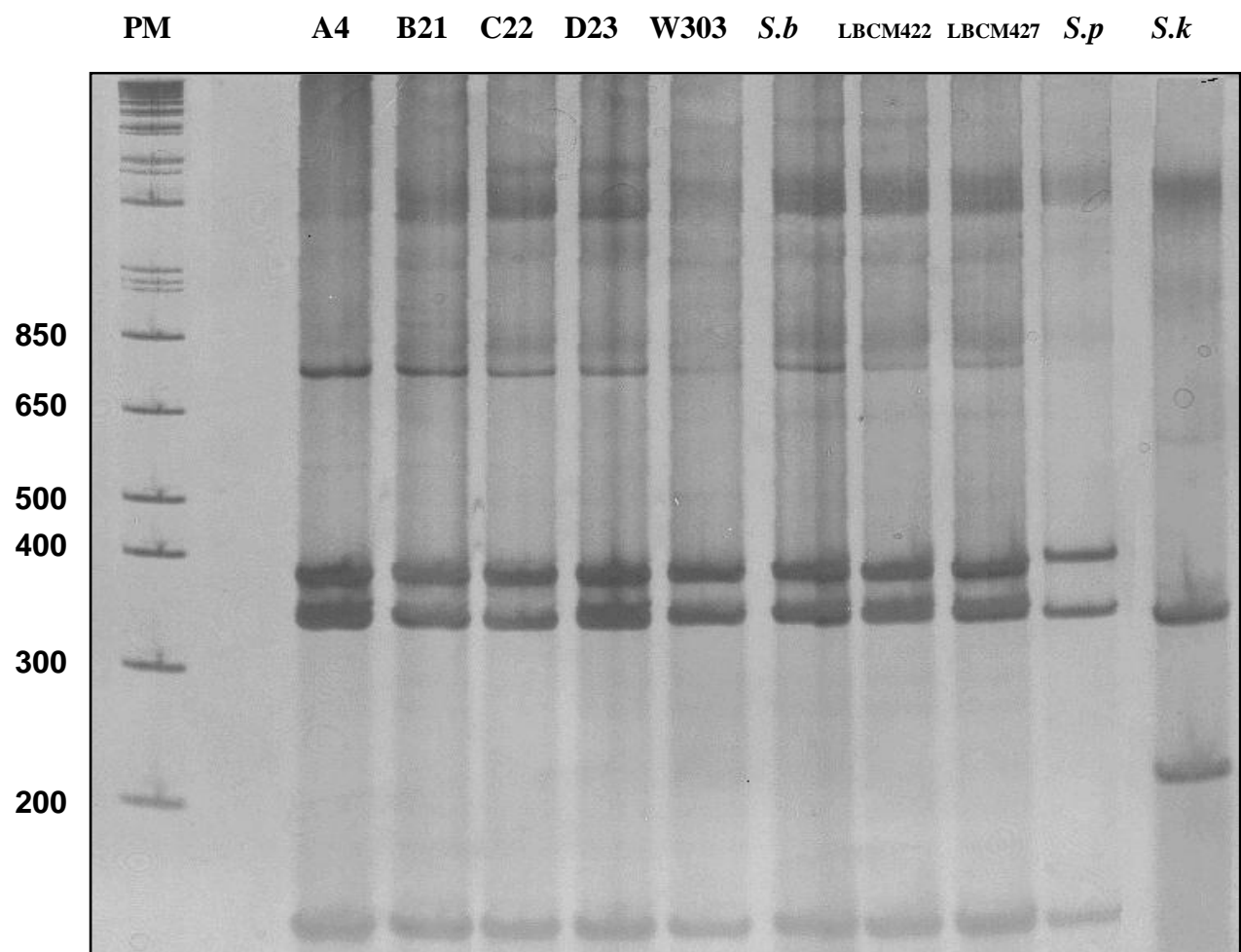


Figura 5: Gel de acrilamida corado com prata apresentando o produto de digestão do fragmento de ITS com a enzima *CfoI*. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

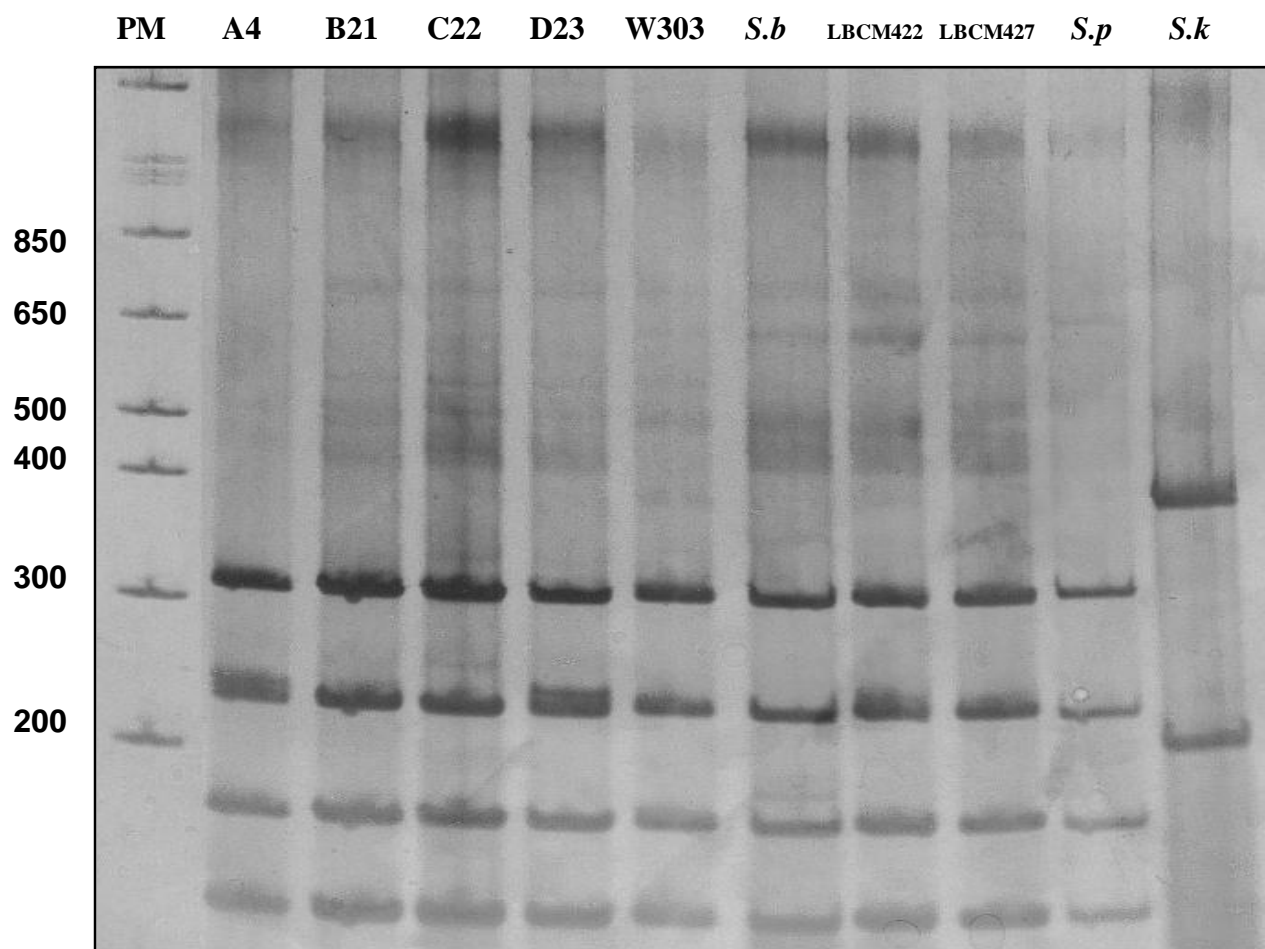


Figura 6: Gel de acrilamida corado com prata apresentando o produto de digestão do fragmento de ITS com a enzima *Hae*III. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

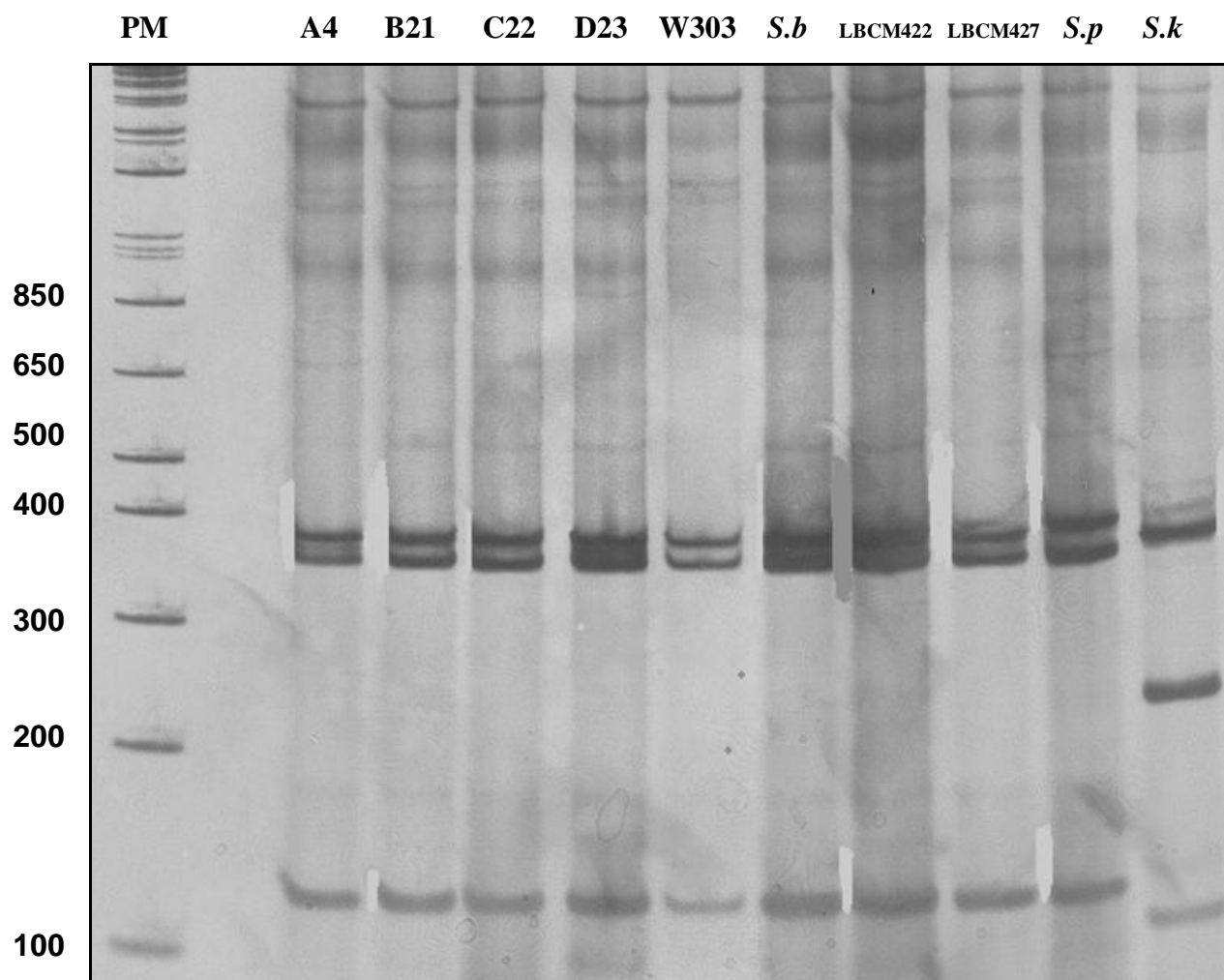


Figura 7: Gel de acrilamida corado com prata apresentando o produto de digestão do fragmento de ITS com a enzima *HinfI*. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen).

4.3- Polimorfismo molecular das cepas

4.3.1- Diferenciação por RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

Em vários trabalhos têm sido descrita a utilização da técnica de RAPD-PCR para diferenciar cepas de leveduras e determinar o grau de polimorfismo (Barros Lopes *et al.*, 1996; Guerra *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2001; Plengvidhya *et al.*, 2004). Deste modo, as cepas selecionadas foram comparadas com as demais linhagens utilizadas no teste anterior através de RAPD-PCR utilizando os *primers* EI1 e LA1 baseados no sítio de *splicing* dos introns. Esta técnica foi utilizada em nosso trabalho para diferenciar as linhagens e demonstrar a grande variabilidade de cepas que ocorre durante a fermentação da cachaça como descrito por Guerra *et al.*, 2001.

O perfil de bandas gerado pelas quatro cepas A4, B21, C22 e D23 foi muito similar, quer seja pelas bandas detectadas quer pela intensidade da coloração obtida, não havendo diferenças significativas entre as linhagens (Figura 8). Para as cepas LBCM 422 e LBCM 427, apesar de pertencerem a mesma cachaçaria, ambas possuem perfil diferenciado de resistência a drogas, porém apenas uma banda de 1600 pb presente na cepa LBCM 422 as diferenciam. Já as cepas das espécies *S. boulardii* e *S. cerevisiae* (W303), também se mostraram muito parecidas com as cepas isoladas das cachaçarias, se diferenciando pela presença de uma banda de 900 pb para *S. boulardii* e duas bandas uma de 850 pb e uma de 1000 pb para *S. cerevisiae* (W303). As espécies *S. paradoxus* e *S. kluyveri* se apresentaram bastante diferenciadas e foram as únicas que apresentaram um perfil molecular completamente distinto das demais cepas da espécie *S. cerevisiae*.

4.3.2- Diferenciação por PCR do gene mitocondrial COXI

Este método é baseado na variação do número e posição dos introns no gene mitocondrial *COXI* (López *et al.*, 2003), segundo o autor a variação destes introns tem sido também reportada entre cepas da mesma espécie.

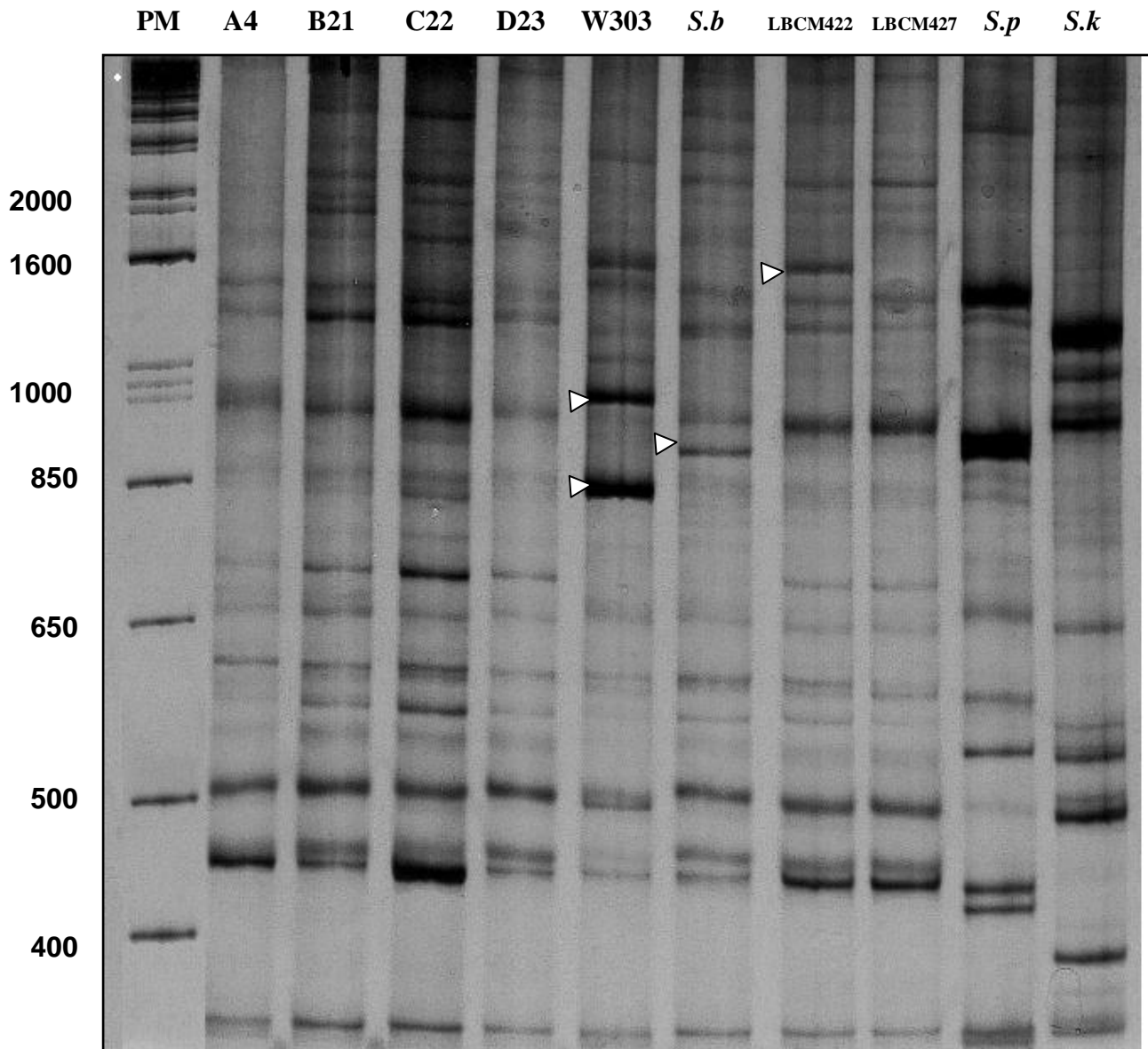


Figura 8: RAPD-PCR, produto obtido após amplificação com os *primers* EI1 e LA1 de diferentes espécies *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. kluyveri*. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen). As setas indicam as bandas que diferenciam as leveduras.

Em função dos resultados obtidos anteriormente, as cepas foram submetidas a este método para diferenciação das linhagens *S. cerevisiae* utilizadas na produção de cachaça. Na Figura 9 podemos observar o resultado da reação de amplificação com os 4 *primers* (3L, 3R, 4L e 5R), na qual cada cepa apresentou um perfil diferenciando, mostrando que apesar da grande similaridade há um polimorfismo molecular entre as cepas analisadas. Na cepa A4 podemos observar a presença de fragmentos de 50 pb, 60 pb e 240 pb, já as demais cepas além dos fragmentos anteriores observamos também na B21 uma banda de aproximadamente 360 pb, na C22 temos uma banda de 420 pb e na D23 uma banda de 300 pb que as diferenciam umas das outras.

A cepa W303 da espécie *S. cerevisiae* apresentou um perfil de bandeamento bem diferenciado, o qual pode ser evidenciado pela presença de fragmentos de 450 pb, 620 pb e 650 pb, enquanto a espécie *S. boulardii* se caracterizou pela ausência destas bandas. As cepas LBCM 422 e LBCM 427, pertencentes a coleção do laboratório, apresentaram um perfil muito similar se diferenciando pela presença de uma banda de aproximadamente 720 pb na cepa LBCM 422. Na cepa da espécie *S. paradoxus* podemos observar a presença de duas bandas, uma de 250 pb e uma de 450 pb e na espécie *S. kluyveri*, a qual é completamente diferente das demais cepas, observamos apenas uma banda de 500 pb.

4.3.3- Diferenciação por Cariotipagem

O polimorfismo cromossomal foi utilizado como ferramenta para diferenciação e caracterização de cepas *Saccharomyces cerevisiae* como descrito por Schüller *et al.* (2004a), na qual foram analisadas 23 cepas de *S. cerevisiae* comerciais e utilizando a técnica de análise do cariótipo foi possível obter a discriminação de 22 cepas diferentes.

A aplicação desta técnica em nossas cepas de leveduras possibilitou uma clara diferenciação de cada cepa pelo perfil cromossomal específico. Como mostrado na Figura 10, cada levedura apresentou um perfil de bandeamento distinto demonstrando que há uma grande diversidade genética entre as cepas analisadas. Mesmo as cepas utilizadas na produção de cachaça selecionadas pelos mesmos critérios bioquímicos, apresentaram

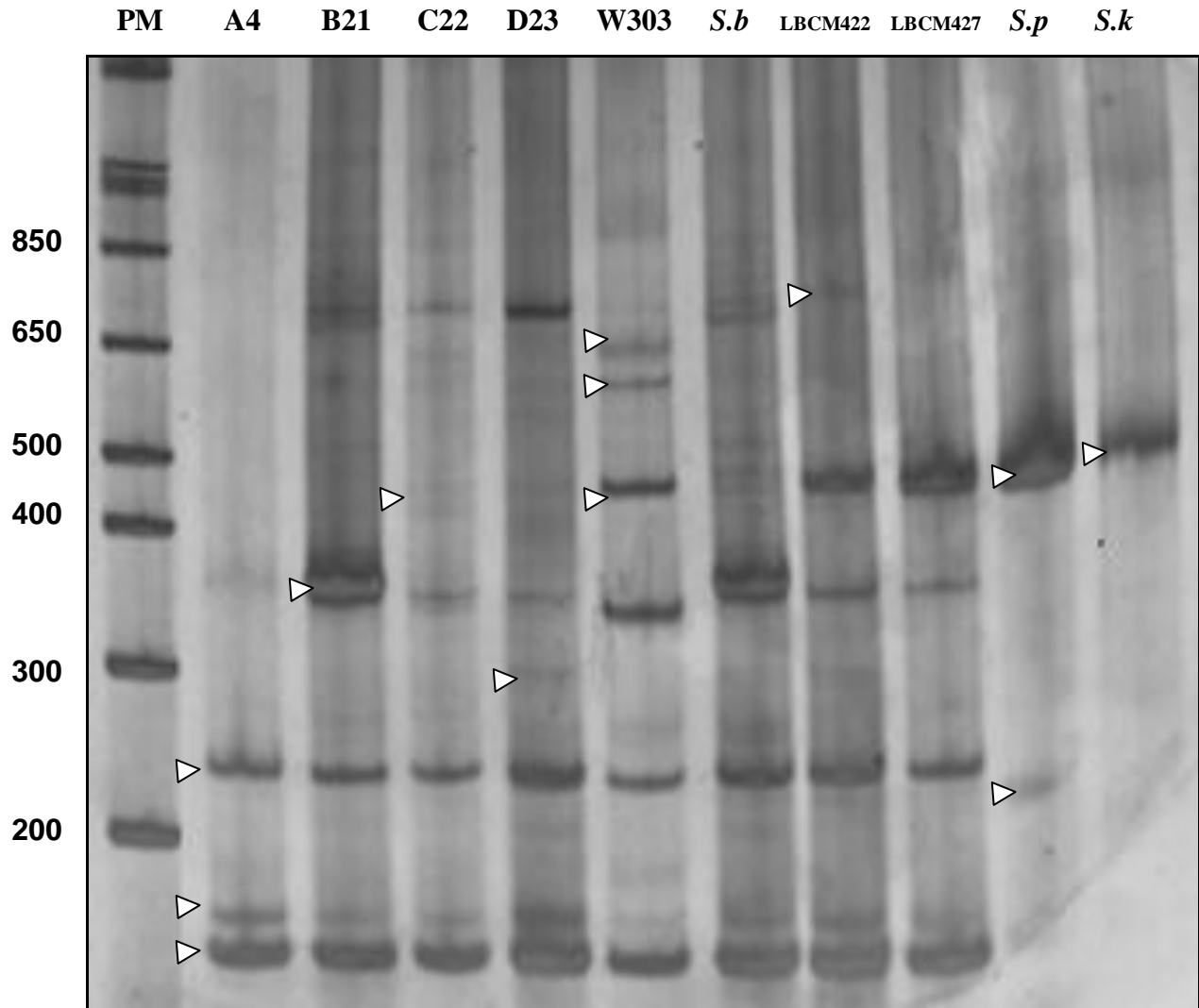


Figura 9: Produto de PCR obtido após amplificação com os *primers* 3L, 3R, 4L e 5R de diferentes espécies *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. kluyveri*. O método é baseado na variação do número e posição dos introns do gene mitocondrial *COXI*. PM representa o padrão de peso molecular (1KB Invitrogen). As setas indicam as bandas que diferenciam as leveduras.

A4 B21 C22 D23 W303 *S. b* LBCM 422 LBCM 427 *S. p* *S. k*

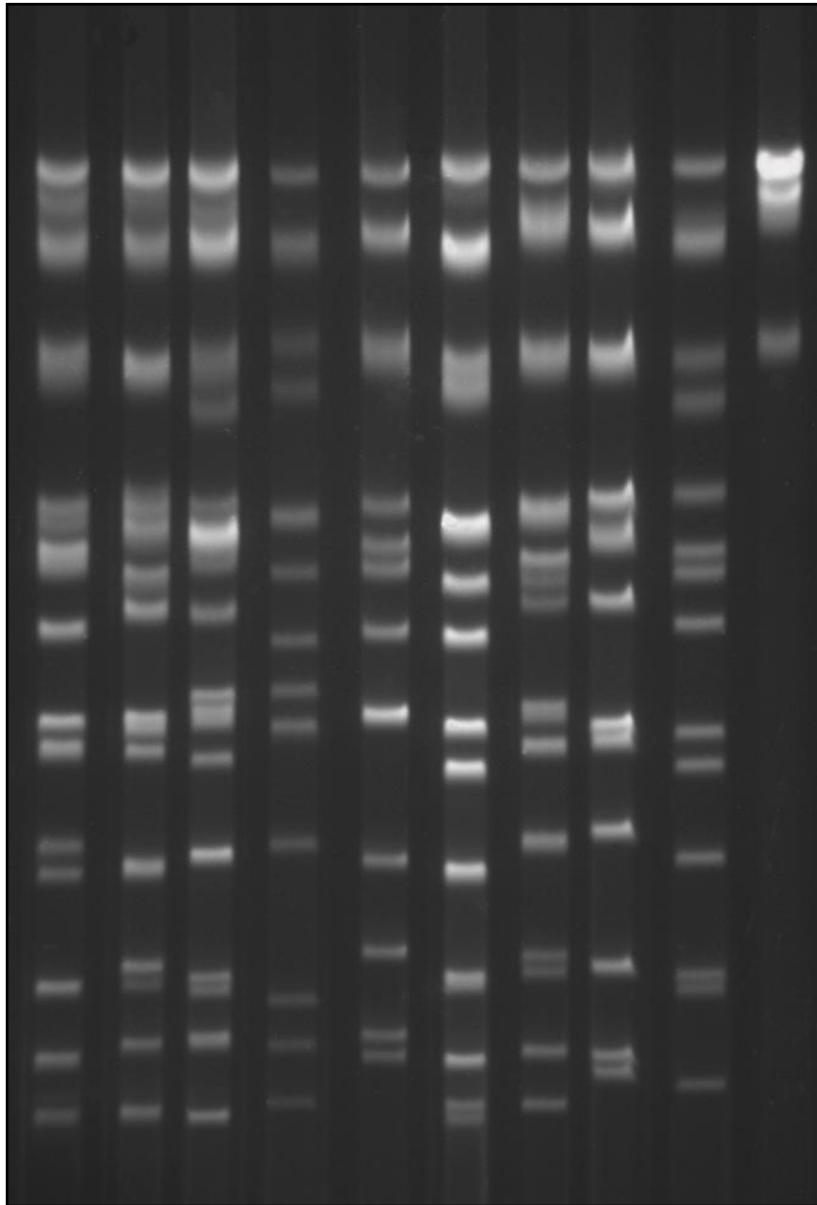


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, mostrando o perfil do cariótipo de diferentes espécies *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. kluyveri*. Este experimento foi realizado na Universidade do Minho em Braga, Portugal pelas doutoras Dorit Schuller e Margarida Casal.

fragmentos de tamanhos diferentes, comprovando que há um grande polimorfismo molecular entre as cepas utilizadas no processo fermentativo da cachaça.

4.4- Parâmetros fermentativos

Como demonstrado por Oliveira *et al.* (2004), os parâmetros fermentativos são importantes na seleção de cepas que podem dominar a fermentação. Deste modo além da seleção de cepas de leveduras utilizadas na produção de cachaça pelos critérios bioquímicos e fisiológicos descritos anteriormente, resolvemos também analisar as cepas quanto a capacidade fermentativa como descrito no item 3.15 de material e métodos, cujos resultados são apresentados a seguir.

4.4.1- Determinação da curva de crescimento

Na Figura 11 (Painel A) podemos observar os resultados da determinação do crescimento celular. As leveduras demonstraram comportamento diferenciado de crescimento, sendo que as cepas B21 e C22 apresentaram uma taxa de crescimento maior que as cepas A4 e D23. O perfil da curva de crescimento das quatro cepas testadas foi bastante semelhante. O crescimento celular iniciou com DO a 600 nm próxima de 1, a qual corresponde a $1,0 \times 10^6$ células/ml, passando logo para a fase exponencial de crescimento e permanecendo neste estágio até 21 horas de cultivo. A partir de 21 horas observou-se a fase estacionária de crescimento interrompida com 36 horas de cultivo.

4.4.2- Determinação do consumo de sacarose

A Figura 11 (Painel B) mostra o consumo de sacarose em função do tempo. Este resultado está em acordo com os resultados obtidos com o crescimento celular. Podemos observar um rápido consumo da sacarose presente no meio, entre o início da fermentação

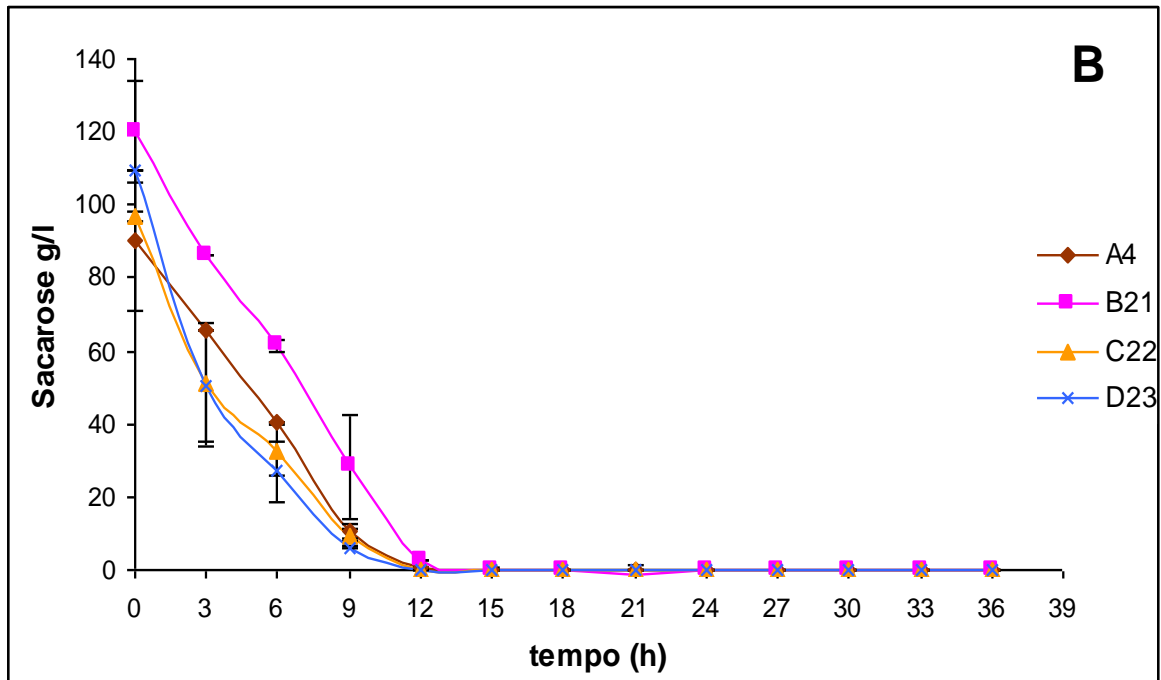
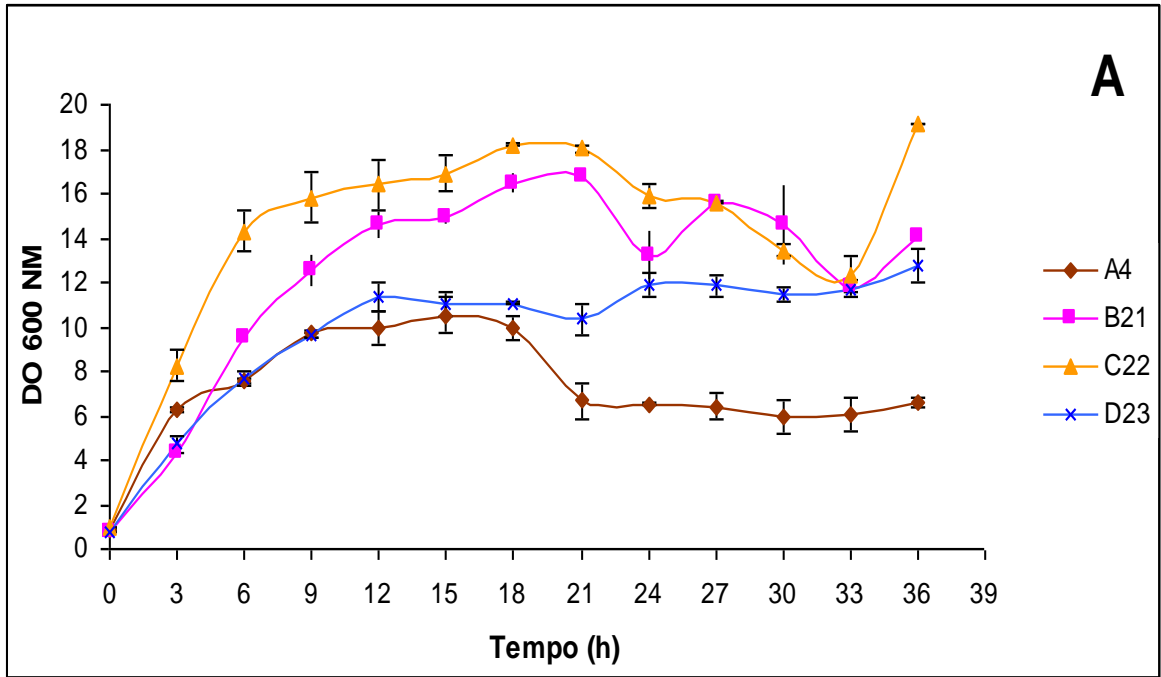


Figura 11: Determinação da curva de crescimento celular e consumo de sacarose. As leveduras foram submetidas ao meio YP sacarose 16% e alíquotas foram coletadas a cada três horas para análise. **A** - crescimento celular; **B** - consumo de sacarose.

até 12 horas de crescimento, quando então a sacarose foi aparentemente totalmente consumida.

4.4.3- Determinação de etanol

O etanol produzido pelas leveduras selecionadas ao longo do tempo de crescimento é apresentado na Figura 12. Como pode ser observado, ao longo do tempo de crescimento ocorre um aumento na concentração de etanol do meio. Após a concentração máxima de etanol há uma tendência a estabilização.

4.4.4- Determinação de álcool isoamílico, acetato de isoamila, ácido capróico e caproato de etila.

Os resultados das dosagens dos teores de álcool isoamílico e ácido capróico produzido pelas cepas A4, B21, C22 e D23 cultivadas em meio contendo 16% de sacarose estão apresentados nas Figura 13, Painéis A e B, respectivamente.

Como observado, a produção de álcool isoamílico foi bastante elevada nas quatro cepas não havendo diferença entre as cepas selecionadas. Em relação ao teor de ácido capróico, a produção foi pequena, havendo uma maior produção pela cepa C22, seguida pelas cepas B21, A4 e D23, respectivamente. Por outro lado, em relação à produção de acetato de isoamila e caproato de etila, a presença destes ésteres não foi detectada nos destilados oriundos da fermentação de ambas as cepas.

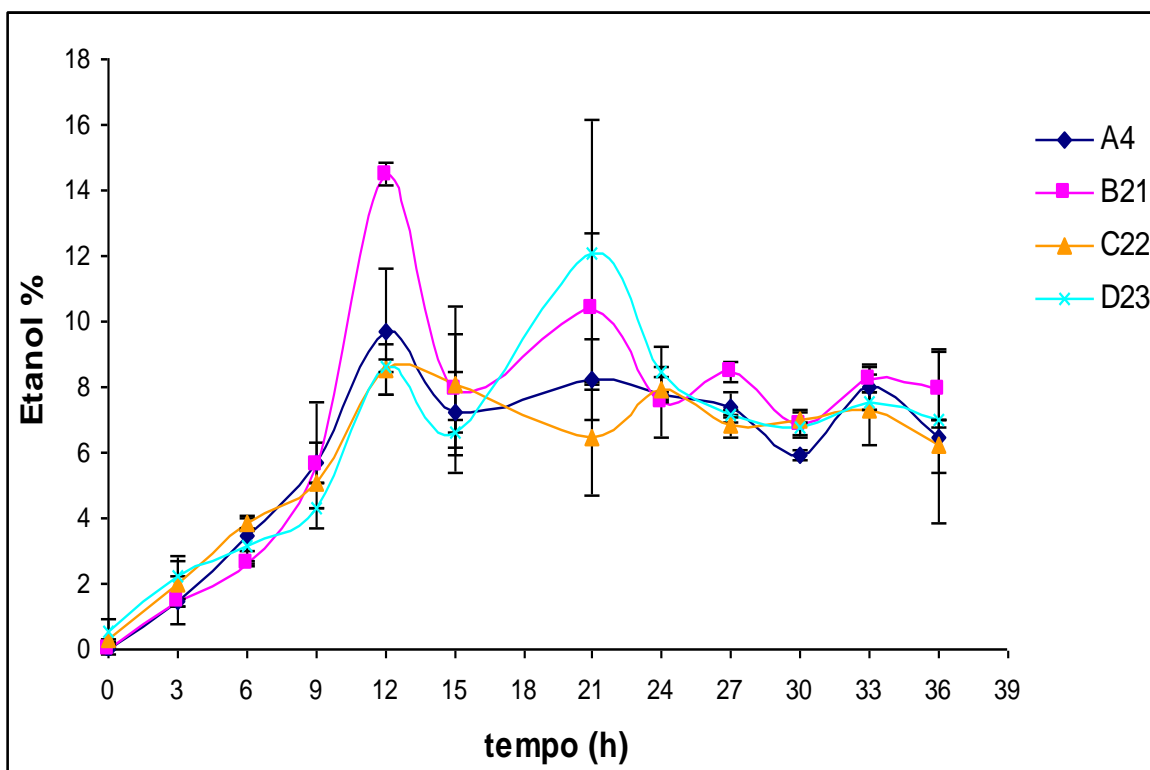


Figura 12: Determinação da produção de etanol. As cepas de leveduras foram cultivadas em meio YP sacarose 16%, a cada 3 horas foi coletada uma alíquota para análise.

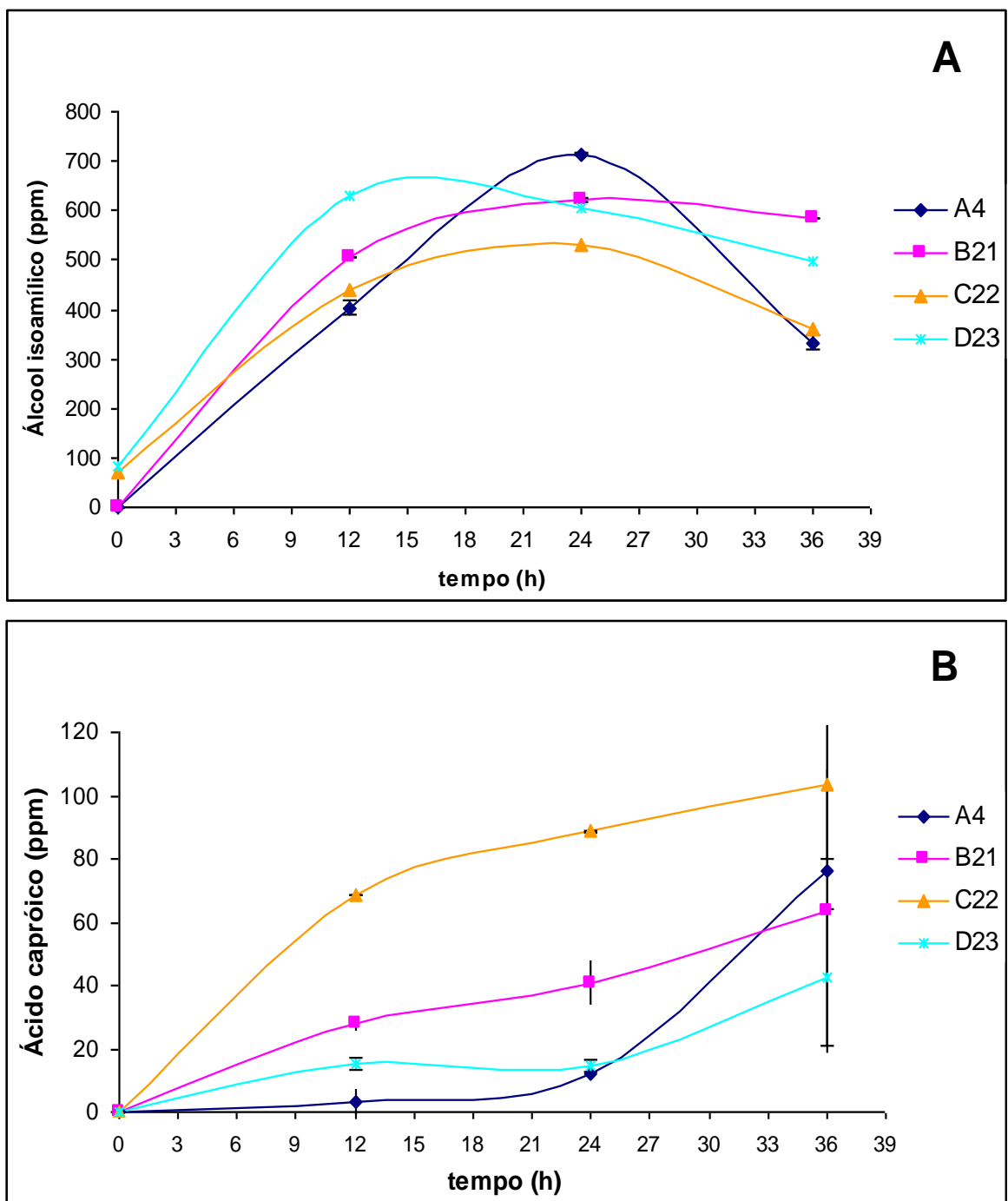


Figura 13: Determinação de álcool isoamílico e ácido caprótico. As cepas de leveduras foram cultivadas em meio YP sacarose 16%, a cada 3 horas foi coletada uma alíquota para análise. **A** – dosagem de álcool isoamílico; **B** – dosagem de ácido caprótico.

DISCUSSÃO

5- Discussão

A “cachaça de alambique de Minas” produzida de acordo com o processo de elaboração previsto no decreto nº 42.644 de 05/06/2002, está proporcionando aos produtores de cachaça a oportunidade de disputar o mercado com outras bebidas destiladas como o rum, a vodka e o whisky. A padronização do produto vem ampliando o mercado interno e desencadeando novas oportunidades de exportação (SEBRAE, 2002).

A produção mineira de cachaça, por motivos históricos e culturais, segue métodos tradicionais há vários séculos. O grande sucesso desta bebida no mercado interno e externo pode ser devido a grande tradição mineira, a qual contribuiu para que se mantivesse, mesmo escondida na clandestinidade, a atividade de produção de cachaça de alambique, em volumes que lhe conferem hoje a liderança nacional. Porém, durante a produção de cachaça o produtor vem procurando melhorar a fermentação e a destilação, buscando um produto de melhor qualidade que tenha sustentação no mercado.

A “cachaça de alambique de Minas” é a mais famosa das cachaças brasileiras e se constitui em um patrimônio para o Estado. Além de ser processada de acordo com as características históricas e culturais de cada uma das regiões do Estado, em seu rótulo pode ser indicada sua origem.

No presente trabalho foram coletadas quatro amostras de mosto de duas grandes regiões do Estado de Minas Gerais, sendo duas amostras do Sul / Sudeste de Minas e duas do Norte de Minas / Jequitinhonha. As duas regiões são famosas pela produção de cachaça de boa qualidade, agradável ao paladar, porém com características distintas em seu sabor e aroma devido a quantidade de compostos que conferem sabor e aroma. Como exemplo temos a análise do teor de álcool isoamílico, um importante composto secundário encontrado nas cachaças, que foi quantificado em várias cachaças do Estado de Minas Gerais. Como mostrado na Figura 14, as amostras B e C que representam o Norte de Minas / Jequitinhonha, apresentaram maior quantidade de álcool isoamílico do que as amostras A e D da região Sul / Sudeste de Minas.

As amostras de mosto foram coletadas nas destilarias de produção artesanal de cachaça e o protocolo descrito por Vicente *et al.* (2005) foi utilizado para seleção e

identificação das cepas de leveduras. Como outros autores já demonstraram a espécie de levedura predominante nos processos fermentativos da cachaça é a *Saccharomyces cerevisiae* (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.*, 2000). Já foi demonstrado também que durante a fermentação alcoólica do suco de uva na fabricação do vinho, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal responsável pela produção de ésteres que são encontrados em grande quantidade nesta bebida, possuindo assim grande importância na definição da qualidade da bebida (Lilly *et al.*, 2000; Nonato *et al.*, 2001). Deste modo, decidimos selecionar apenas a espécie *S. cerevisiae* e excluir todas as demais encontradas nas amostras coletadas nas destilarias.

As amostras coletadas foram inoculadas em meio YPD 2% adicionado de ampicilina 100 µg/ml. Este inóculo inicial permitiu o isolamento de um elevado número de cepas. Assim, cerca de 1.000 colônias de leveduras de cada cachaçaria foram obtidas e posteriormente submetidas a testes de identificação e seleção.

A seleção de cepas de leveduras utilizadas no processo fermentativo tem uma grande importância econômica na produção de bebidas. Estas linhagens iniciadoras, além de assegurar a estabilidade do processo fermentativo, garantem um produto final de qualidade semelhante durante toda a safra (Fleet e Gillian, 1985; Martinez *et al.*, 1990; Sanni e Lonner, 1993; Romano *et al.*, 2003).

O isolamento e a identificação de cepas *Saccharomyces cerevisiae* no grupo de leveduras obtidas foi realizado de acordo com a sistemática de Vaughan-Martini e Martini (1983), testando a capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono e de assimilação de nitrogênio por um mesmo período de tempo. Inicialmente, as colônias foram submetidas à capacidade de assimilação de diferentes fontes de nitrogênio, sendo que apenas três colônias foram excluídas entre as 4.270 colônias de leveduras analisadas, sendo pouco eficientes na exclusão de leveduras não *S. cerevisiae*. Tendo em vista os custos e o aspecto laborioso deste tipo de procedimento, o que dificulta sua aplicação a um número elevado de leveduras, foram selecionadas aleatoriamente aproximadamente 600 colônias de leveduras de cada cachaçaria para serem submetidas aos demais testes de identificação e isolamento. Como somente as leveduras *S. cerevisiae* eram de nosso interesse, as fontes de

carbono usadas no teste de crescimento foram escolhidas priorizando aquelas que permitissem a exclusão de um maior número de leveduras de outras espécies. Como observado nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, 104 cepas (15,07%) foram excluídas entre as 690 cepas analisadas da cachaçaria A, 180 cepas (26,47%) entre as 680 cepas da cachaçaria B, 340 cepas (47,65%) entre as 640 cepas da cachaçaria C e finalmente 114 (18,24%) entre as 625 cepas analisadas da cachaçaria D, respectivamente. Assim como descrito por Guerra *et al.* (2001), uma grande variedade de leveduras *S. cerevisiae* com biótipos fisiologicamente diferentes foram isoladas, incluindo isolados capazes de assimilar glicerol, diferentemente do padrão descrito para a espécie por Vaughan-Martini e Martini (1998). Estes resultados sugerem que as cepas obtidas apresentam um perfil compatível com a espécie *S. cerevisiae*.

Dentre as cepas analisadas a grande maioria, cerca de 63,95%, foi identificada como *S. cerevisiae*, estando de acordo com os dados obtidos por Pataro *et al.* (2000). Os resultados sugerem que a estratégia de realizar testes prévios com diferentes fontes de carbono elimina a maioria das cepas não *Saccharomyces*, formando um grupo que possibilita a escolha aleatória de leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* ou a espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

A próxima etapa no desenvolvimento deste trabalho foi a seleção de leveduras que atendessem a critérios e características mais apropriadas ao processo de produção da cachaça. Algumas características, tais como a não produção de H₂S, a qual agrega odor e sabor desagradável à bebida, e tolerância a etanol e a temperaturas mais elevadas, que são condições existentes normalmente na dorna, são algumas características importantes que a levedura selecionada deve apresentar para serem resistentes ao processo fermentativo. (Iranzo *et al.*, 1998; Ribeiro e Horii, 1999). Deste modo, foram escolhidas aleatoriamente 140 cepas de leveduras de cada cachaçaria identificadas como *S. cerevisiae* para serem submetidas a estes testes.

Inicialmente, as 140 cepas de leveduras foram submetidas ao teste de produção de H₂S, sendo que neste teste apenas uma levedura foi excluída do grupo, a qual se encontrava na cachaçaria B. Em seguida, as cepas foram submetidas a teste de crescimento na presença de elevadas temperaturas e alta concentração de etanol, sendo que as leveduras mostraram-

se bem adaptadas à temperatura de 37° C e a 15% de etanol, sugerindo que essas cepas de leveduras suportam as condições encontradas nas dornas de fermentação.

Muitos estudos têm sido realizados buscando a obtenção de cepas de leveduras mais apropriadas à produção de bebidas como o sake, o vinho e a cerveja (Ulm *et al.*, 1972; Ashida *et al.*, 1987; Ichikawa *et al.*, 1991; Yoshizawa, 1999; Akada *et al.*, 1999). Vicente *et al.* (2005), na procura por cepas que apresentassem uma maior produção de compostos secundários, imprescindíveis à obtenção de bebidas de qualidade como a cachaça, selecionou cepas de leveduras resistentes a TFL e a cerulenina, as quais produziam maior quantidade de álcool isoamílico e de ácido capróico. Deste modo, decidimos também incorporar testes de resistência a drogas específicas para obtenção de cepas de leveduras com maior capacidade de produção de substâncias que conferem sabor e aroma.

Como abordado anteriormente, a via biossintética da L-leucina tem como ponto de regulação a enzima α -isopropilmalato sintase, que é uma enzima alostérica retroinibida por altas concentrações de L-leucina. O análogo de L-leucina, TFL, é um composto que permite selecionar leveduras que perderam a capacidade de retroinibição por L-leucina, e como consequência produzem maiores quantidades de álcool isoamílico e/ou acetato de isoamila (Satyanarayana *et al.*, 1968; Ulm *et al.*, 1972; Ashida *et al.*, 1987; Casalone *et al.*, 1997; Cavalieri *et al.*, 1999; Yoshizawa, 1999; Sluis *et al.*, 2002). Por outro lado, a cerulenina é uma droga inibidora da ácido graxo sintetase, e como já comentado anteriormente, essa droga seleciona leveduras que apresentam desregulação da biossíntese de ácidos graxos, podendo apresentar maior produção de ácido capróico e conseqüentemente, caproato de etila (Ichikawa *et al.*, 1991; Akada *et al.*, 1999; Asano *et al.*, 1999 e 2000).

Como observado na Tabela 5, dentre as 140 cepas de leveduras analisadas de cada cachaçaria, foram obtidas no total 115 cepas resistentes a ambos os compostos, as quais correspondem a 20,5% do total de cepas analisadas. A maioria das cepas apresentou um quadro comportamental de resistência quando incubadas em presença de cerulenina e praticamente todas as cepas resistentes a TFL foram também resistentes a cerulenina. A cachaçaria C foi a que apresentou maior número de cepas resistentes a ambos os compostos, chegando à cerca de 53% de resistência; nas cachaçarias A, B e D o perfil de

resistência a ambos os compostos foi de 26%, 28% e 37%, respectivamente. Estes resultados sugerem que a irregularidade na composição de produtos que conferem sabor e aroma observados durante uma safra, e mesmo entre várias safras distintas, pode decorrer da diversidade da população de leveduras no processo fermentativo da cachaça. Indiretamente, estes resultados também sugerem que é necessário estabelecer uma identidade de compostos que ofereçam qualidade a bebida e assim selecionar leveduras que produzam maiores quantidades destes compostos durante a fermentação.

Com a intenção de selecionarmos leveduras que apresentem um conjunto de propriedades extremamente adequadas às condições de produção de cachaça de alambique, outros critérios como a alta capacidade fermentativa, a capacidade de floculação e a produção de micocinas foram também utilizadas no processo seletivo de nossas cepas.

A alta capacidade fermentativa das cepas é uma característica importante na seleção de leveduras utilizadas no processo fermentativo. Considerando que no caso da produção de cachaça o principal substrato para a fermentação é a sacarose, a atividade invertásica foi então incluída como critério de seleção de cepas *S. cerevisiae*, uma vez que já foi estabelecido que para substratos contendo sacarose há uma forte correlação entre capacidade fermentativa e níveis de atividade invertásica (Ekunsanmi e Odunfa, 1990; Pataro *et al.*, 1998 e 2000; Vicente *et al.*, 2005). Para realização deste teste as cepas foram submetidas a dosagem da atividade invertásica utilizando a rafinose e a glicose como substrato de crescimento. A glicose e outras fontes de carbono como frutose e manose, são rapidamente fermentáveis e reprimem a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de outras fontes de carbono como a sacarose (Gancedo, 1998). O gene *SUC2* que codifica a enzima invertase tem a sua expressão reprimida na presença de glicose. Assim, quando a levedura é crescida em meio rico contendo glicose, o gene *SUC2* está reprimido e a expressão da invertase é baixa. Por outro lado, se a levedura é crescida em rafinose (trissacarídeo com uma molécula de glicose, uma de frutose e uma de galactose) a transcrição do gene *SUC2* é desreprimida gerando uma alta atividade invertásica.

Desta forma, foram analisadas 6 cepas de leveduras de cada cachaçaria escolhidas aleatoriamente entre as 115 cepas resistentes a TFL e a cerulenina. Como apresentado na Figura 3, a maioria das cepas de leveduras analisadas apresentou uma alta atividade invertásica quando cultivadas em rafinose e baixa quando em glicose. Como as cepas com maior atividade invertásica têm maior capacidade fermentativa, adotamos como critério a seleção de cepas com atividade maior que 10.000 U. A. E., assim das 24 cepas analisadas apenas três cepas foram excluídas, resultando na seleção de 21 cepas de leveduras. Este resultado sugere que a maioria das cepas possui uma boa capacidade fermentativa, mas ainda assim com significativas diferenças, o que pode ser utilizado como critério para a seleção de cepas para a produção de cachaça de alambique.

A capacidade de floculação é outra característica importante das leveduras, visto que facilita o processo de separação e a reutilização das células no final de cada ciclo de fermentação. A floculação pode ser definida como o fenômeno na qual as células de leveduras se aderem formando grumos que sedimentam rapidamente no meio na qual estão suspensas (Jin *et al.*, 2001; Finn e Stewart, 2002). Na indústria cervejeira a floculação tem considerável importância, uma vez que produz um meio com características pertinentes a cerveja, diminui os custos e é aplicada para separar as leveduras do produto final da fermentação (Jin e Speers, 1998; Jibiki *et al.*, 2001; Verstrepen *et al.*, 2001; Finn e Stewart, 2002; Powell *et al.*, 2003).

Em nosso trabalho, observamos a capacidade de floculação espontânea das 21 cepas selecionadas anteriormente. Como mostrado na Tabela 6, as cepas de leveduras apresentaram um perfil variável de floculação nas cachaçarias A e C, sendo que na cachaçaria B nenhuma levedura floculou e na cachaçaria D todas as cepas foram floculantes. Do total de cepas analisadas, 13 flocularam (61,9%) e 8 (31,1%) não flocularam. Algumas variações de parâmetros que ocorrem durante a fermentação como pH, agitação e presença de açúcares, podem influenciar na floculação (Ostergaard *et al.*, 2000; Verstrepen *et al.*, 2001; Jibiki *et al.*, 2001; Finn e Stewart, 2002). Deste modo, uma cepa de cada cachaçaria foi selecionada para prosseguir nos experimentos posteriores. As cepas selecionadas foram de preferência floculantes, porém, devido ao fato de nenhuma

cepa ser floculante na cachaçaria B, foi selecionada então uma cepa não floculante nesta cachaçaria.

As cepas de leveduras A4, B21, C22 e D23 foram posteriormente submetidas ao teste de produção de micocinas. Todas as quatro cepas testadas contra as linhagens *Cândida glabrata* NCYC 388 e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006, foram produtoras de micocinas e neutras para micocinas produzidas. O uso de cepas produtoras de micocinas em fermentações tem como finalidade eliminar linhagens contaminantes sensíveis, evitando perdas durante o processo fermentativo (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.*, 1998). Segundo Heard e Fleet (1987), linhagens “killer” de *S. cerevisiae* tem sido usadas como iniciadoras em fermentações de vinho para prevenir o crescimento de cepas selvagens. De acordo com os resultados obtidos, as quatro cepas analisadas apresentaram em grande potencial como iniciadoras do processo fermentativo, utilizando o critério de produção e de resistência as micocinas produzidas.

Para evitar dúvidas sobre a identificação das cepas selecionadas, foram analisadas as seqüências das regiões do DNAr das cepas A4, B21, C22 e D23. A amplificação da região de ITS (*internal transcribed space*) do DNAr de ambas as cepas mostraram produtos de PCR com tamanhos compatíveis com o que é descrito para a espécie *S. cerevisiae* (Figura 4). A região do rDNA mostra baixa variabilidade intra-espécie e alto polimorfismo inter-espécie o que justifica o uso da técnica para identificar espécies. O produto de amplificação da região de ITS foi submetido a corte com as endonucleases de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI* (Figuras 5, 6 e 7), o resultado da digestão comprova claramente que as cepas analisadas pertencem a espécie *S. cerevisiae*. Alguns autores têm utilizado o produto de amplificação da região de ITS para diferenciar isolados do grupo *Saccharomyces sensu stricto* de outras espécies *Saccharomyces* (Huffman *et al.*, 1992; Valente *et al.*, 1996). Os resultados demonstram que a ferramenta molecular de análise de restrição da região amplificada de ITS do DNAr pode ser útil na identificação de leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto*. Apesar desta técnica ter sido precedida por métodos bioquímicos de identificação clássica como descrito anteriormente neste estudo, verificamos que é possível identificar todas as cepas de leveduras isoladas de fermentações

espontâneas apenas por análise molecular, já que, esta técnica pode ser considerada rápida, reproduzível e relativamente barata (Heras-Vasquez *et al.*, 2002).

Com o advento do uso de cepas selecionadas no processo fermentativo de bebidas destiladas, o uso de técnicas que possibilitem distinguir cepas inoculadas do restante da flora indígena se tornou uma necessidade de grande interesse prático. A necessidade de diferenciação das cepas levou ao desenvolvimento de técnicas moleculares para diferenciar e acompanhar durante todo o processo fermentativo as cepas de leveduras selecionadas e inoculadas no início do processo. Devido ao grande polimorfismo molecular encontrado entre as cepas de leveduras que participam do processo fermentativo da cachaça (Pataro *et al.*, 2000), resolvemos então aplicar técnicas moleculares como PCR e cariotipagem para caracterizar e diferenciar nossas cepas de leveduras.

De início, aplicamos a técnica de RAPD-PCR utilizando os *primers* EI1 e LA1, para identificação das cepas de leveduras pertencentes ao grupo *Saccharomyces sensu stricto* e também para diferenciação intra-espécie das cepas. Barros Lopes *et al.* (1996), utilizando estes iniciadores detectaram um grande polimorfismo entre as cepas de vinho analisadas, mostrando que o método é eficiente na diferenciação de cepas comerciais e de cepas indígenas *S. cerevisiae* e não *Saccharomyces*. Por outro lado, Torriani *et al.* (1999) e Andrichetto *et al.* (2000) utilizaram o iniciador M13 para identificação de espécies de leveduras. Os resultados encontrados por estes autores mostram que as análises de RAPD-PCR de cepas de diferentes espécies de leveduras apresentam perfis de bandamento distintos que permitem uma clara diferenciação de todas as espécies analisadas. Em nossos resultados, como observado na Figura 8, o perfil de bandas gerado pelas quatro cepas A4, B21, C22 e D23 foi muito semelhante não permitindo uma pronta distinção entre as cepas. A variabilidade obtida com a análise por RAPD-PCR depende dos iniciadores utilizados (Perez *et al.*, 2001). Os resultados obtidos utilizando RAPD-PCR com os *primers* EI1 e LA1 sugerem que esta técnica pode ser eficiente na diferenciação de cepas de leveduras pertencentes ao grupo *Saccharomyces sensu stricto*, e na distinção de cepas muito próximas, que podem ser consideradas da mesma espécie como as cepas W303 (*S. cerevisiae*) e *S. boulardii*. Porém, cepas *S. cerevisiae* isoladas do processo fermentativo da

cachaça apresentaram poucas diferenças entre si utilizando RAPD-PCR, mostrando que esta técnica é ineficiente na diferenciação de cepas utilizadas na produção desta bebida.

Outra técnica baseada na reação de PCR utilizada na tentativa de diferenciar e caracterizar nossas cepas de leveduras selecionadas foi a PCR do gene mitocondrial *COXI*. Esta técnica foi desenvolvida por Lopez *et al.* (2003) para monitorar fermentações de vinho inoculadas com cepas selecionadas, e seu uso tem sido muito eficiente na análise do polimorfismo molecular de cepas indígenas ou comerciais, além de ter sido muito utilizada em fermentações de vinho para acompanhamento de cepas de leveduras inoculadas. A aplicação desta técnica em nossas cepas para diferenciar cepas de leveduras de diferentes espécies pertencentes ao grupo *Saccharomyces sensu stricto* também foi eficiente.

Como podemos observar na Figura 9, cada cepa apresentou um perfil de bandas, porém com diferenças muito pequenas de uma cepa para outra. Apesar do polimorfismo observado, a diferenciação das cepas de leveduras utilizadas na produção de cachaça somente por esta técnica não é confiável, visto que a diferenciação pode não ser claramente observada, podendo levar possivelmente a falsos resultados, principalmente durante o acompanhamento da dinâmica da cepa utilizada como fermento selecionado em uma fermentação aberta como é o caso da produção de cachaça.

As cepas LBCM 422 e LBCM 427 isoladas em uma mesma cachaçaria na região de Ouro Preto por Vicente *et al.* (2005), apresentam perfil de resistência a drogas diferente, contudo a análise do perfil genético destas cepas de leveduras por RAPD-PCR e por PCR do gene mitocondrial *COXI*, demonstraram que apenas uma banda diferente foi evidenciada na diferenciação destas duas cepas (Figuras 8 e 9). O uso de técnicas moleculares pode não ser suficiente para diferenciação destas cepas, deste modo sugerimos a necessidade de combinar técnicas bioquímicas e moleculares para avaliar a diversidade genética das cepas de leveduras e acompanhamento de sua dinâmica durante o processo fermentativo da cachaça.

Com a utilização da técnica de cariotipagem para caracterização e diferenciação das quatro cepas de leveduras selecionadas podemos observar que cada cepa apresentou um perfil eletroforético distinto. Este resultado era esperado uma vez que as cepas são de

origens diferentes. Na Figura 10 é apresentado o resultado do cariótipo eletroforético de todas as cepas analisadas, na qual podemos observar uma grande diversidade genética.

A cariotipagem tem sido apresentada como uma técnica muito eficiente na discriminação entre cepas geneticamente muito relacionadas como demonstrado por Shuller *et al.* (2004a). A aplicação desta técnica em nossas cepas permitiu diferenciar cada cepa pelo seu perfil cromossomal específico. Deste modo ficou evidente que há um grande polimorfismo molecular entre todas as cepas analisadas apesar das quatro cepas (A4, B21, C22 e D23) terem passado pelos mesmos critérios bioquímicos e fisiológicos de seleção. No processo fermentativo da cachaça há a necessidade de utilização de técnicas que possibilitem a diferenciação e o acompanhamento de cepas selecionadas utilizadas como fermento iniciador, contudo a cariotipagem apesar de ser uma técnica útil na diferenciação de cepas de leveduras, é uma técnica muito cara, demorada e complicada para ser usada no acompanhamento de cepas de leveduras no dia a dia.

Muitos estudos têm sido realizados na busca por alguma correlação entre diversidade genética e distribuição geográfica (Versavaud *et al.*, 1995; Sabate *et al.*, 1998; Schüller *et al.*, 2004b). Em nossos resultados podemos observar que existe uma grande diversidade genética entre as cepas analisadas. Entretanto, as cepas analisadas A4, B21, C22 e D23 pertencem a regiões distintas do Estado de Minas Gerais, sendo que as cepas A4 e D23 representam o Sul / Sudeste de Minas e as cepas B21 e C22 representam o Norte de Minas / Jequitinhonha. Porém, como observado anteriormente, as quatro cepas analisadas apresentaram perfis moleculares distintos mesmo entre cepas de uma mesma grande região, demonstrando que não foi encontrada correlação entre diversidade genética e distribuição geográfica, pelo menos com as amostras estudadas neste trabalho. Entretanto, a comprovação deste dado só é possível se for realizada esta comparação com um número maior de cepas representando diversas regiões, antes das cepas passarem por nossos critérios de pressão seletiva (temperatura, etanol, floculação, drogas, etc).

Após a caracterização molecular, estudamos a capacidade fermentativa das cepas A4, B21, C22 e D23, submetendo-as a crescimento em meio de cultura contendo sacarose como principal nutriente. Conforme pode ser observado na Figura 11, as leveduras

mostraram um perfil de crescimento diferenciado, na qual as cepas B21 e C22 apresentaram uma taxa de crescimento maior do que as cepas A4 e D23 (Painel A), uma maior capacidade de crescimento pode levar a um maior rendimento fermentativo. A Figura 11 mostra ainda que o consumo de sacarose foi semelhante entre as cepas de leveduras, as quais apresentaram uma boa adaptação ao meio com alta concentração de sacarose (16%), tendo consumido praticamente toda a sacarose até 12 horas de crescimento (Painel B).

Quanto a determinação do etanol os resultados sugerem uma máxima produção no tempo de 21 horas, seguida por uma tendência a estabilização conforme mostrado na Figura 12. As quatro cepas apresentaram perfis semelhantes de produção de etanol, sendo que os valores encontrados estão de acordo com o observado por Vicente *et al.* (2005) para as cepas LBCM 422 e LBCM 427. Estes resultados em conjunto sugerem que estas cepas adaptam-se bem ao meio contendo sacarose (16%) com uma máxima produção de etanol em 21 horas, corroborando a validade de um dos critérios de seleção aqui utilizado que foi baseado na alta atividade invertásica como estratégia de obtenção de cepas com boas características fermentativas (Ekunsanmi e Odunfa, 1990).

Os álcoois superiores e ésteres são compostos presentes na cachaça que se incorporam ao sabor e ao aroma da bebida. Esses compostos estão presentes em pequenas quantidades, mas o suficiente para oferecer características próprias à cachaça (Cardello e Faria, 1998; Boscolo *et al.*, 2000; Nonato *et al.*, 2001). Assim, uma vez caracterizados os perfis de crescimento fermentativo das cepas, em condições semelhantes as encontradas nas dornas, dosamos as concentrações de álcool isoamílico; acetato de isoamila; ácido capróico e caproato de etila ao longo da curva de crescimento. Os resultados da Figura 13 demonstram que quanto ao álcool isoamílico (Painel A), todas as cepas apresentaram uma boa capacidade de produção deste álcool superior. Uma vez mais, estes dados estão em acordo com os resultados obtidos quando as leveduras foram testadas quanto a sensibilidade ao TFL, ou seja, cepas resistentes a TFL mostram maior resistência à retroinibição da enzima α -isopropilmalato sintase por L-leucina, tendo como consequência uma grande produção do álcool isoamílico (Satyanarayana *et al.*, 1968; Ulm *et al.*, 1972; Ashida *et al.*, 1987; Yoshikawa *et al.*, 1995; Casalone *et al.*, 1997; Cavalieri *et al.*, 1999;

Yoshizawa, 1999; Sluis *et al.*, 2002). Como demonstrado por Vicente *et al.* (2005), cepas resistentes a TFL são capazes de produzir maior quantidade de álcool isoamílico do que cepas sensíveis. O teor de álcool isoamílico encontrado nos destilados oriundos de processos fermentativos com as cepas A4, B21, C22 e D23, apresentou um valor médio de aproximadamente 600 ppm, enquanto Vicente *et al.* (2005) encontrou com a cepa LBCM 427 (cepa resistente a TFL), cerca de 180 ppm e com a cepa LBCM 422 (cepa sensível a TFL), aproximadamente 120 ppm de álcool isoamílico. O resultado obtido com nossas quatro cepas esta acima do valor preconizado pela legislação para a cachaça que é de no máximo 0,300g/100ml de álcool anidro. Porém, considerando-se que boa parte do teor de álcoois superiores é desprezado durante a destilação na fração correspondente a cabeça, é necessário deste modo uma grande produção destes compostos para se obter uma cachaça dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação.

Por sua vez, o acetato de isoamila, que tem o álcool isoamílico como precursor biossintético, é considerado um dos compostos associados ao aroma de bebidas alcoólicas sendo atribuído a este composto o aroma de fruta ao saquê e a vinhos (Yoshizawa *et al.*, 1999; Asano *et al.*, 2000; Arikawa *et al.*, 2000; Hernandez-Orte *et al.*, 2002). Portanto, tentamos determinar a concentração deste composto nas cepas A4, B21, C22 e D23, porém, os resultados destas dosagens indicaram que nas amostras analisadas não havia uma quantidade detectável deste composto.

O fato das cepas não produzirem adequada quantidade de acetato de isoamila sugere que enzimas como a álcool acetiltransferase e esterase, importantes ao processo de formação deste éster podem estar desreguladas. A não produção de acetato de isoamila pode ocorrer devido a dois fatores: menor atividade da álcool acetiltransferase ou ação da atividade da esterase. Uma mais eficiente produção de acetato de isoamila necessita de um adequado suprimento de substratos (álcool isoamílico e acetil CoA) e um balanço apropriado na atividade dessas enzimas (Fukuda *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2002). Contudo, a atividade da enzima álcool acetiltransferase codificada pelo gene *ATFI*, tem sua atividade diretamente afetada por vários fatores como a oxigenação e a adição de ácidos graxos insaturados ao meio, levando conseqüentemente a uma redução na síntese de ésteres de

acetato (Fujii *et al.*, 1997; Kajiwara *et al.*, 1997; Mason e Dufor, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003a).

Como observado anteriormente, as cepas analisadas apresentaram uma elevada produção de álcool isoamílico e não produziram acetato de isoamila, resolvemos então analisar a expressão do gene *ATF1* e observamos que não houve expressão do gene em nenhuma amostra analisada (dado não mostrado), é provável que este fato seja devido a inibição da atividade da enzima álcool acetiltransferase durante o processo fermentativo, por fatores como por exemplo a oxigenação. Verstrepen *et al.* (2003a e b), demonstraram que a expressão do gene *ATF1* só foi observada em produtos de fermentação obtidos em condições anaeróbicas ou em cepas que superexpressam o gene, confirmando que a metodologia empregada em nossos trabalhos não foi adequada para promover a expressão deste gene.

Por outro lado, o caproato de etila é um importante componente para conferir sabor e aroma ao saquê, que pode ser sintetizado por ação de uma álcool aciltransferase ou de uma esterase, a partir do caproil CoA e etanol ou do ácido caprótico e etanol respectivamente. Ichikawa *et al.*, (1991) isolou 54 colônias mutantes resistentes a cerulenina e medindo a produção de ácido caprótico dessas cepas, encontrou apenas três que produziam grandes quantidades do ácido. Os resultados apresentados na Figura 13 (Painel B) demonstram a presença de ácido caprótico em todas as amostras de destilados oriundas da fermentação pelas cepas A4, B21, C22 e D23, havendo uma maior produção pela cepa C22, seguida pelas cepas B21, A4 e D23, respectivamente. Este resultado está de acordo com as respostas de sensibilidade a cerulenina destas cepas, uma vez que todas as cepas são resistentes a esta droga. A cepa C22 deve ter sintetizado maior quantidade de ácido caprótico devido a uma maior resistência desta cepa a cerulenina, como descrito por Ichikawa *et al.*, (1991). Outro fato importante é que a utilização destas cepas não permitiu a obtenção de destilados nos quais fosse identificada alguma quantidade detectável de caproato de etila. Entretanto é preciso cautela na análise deste resultado, uma vez que a metodologia empregada na fermentação pode não ter sido adequada para promover a

produção deste composto e o processo de destilação das amostras pode não ter sido eficiente para promover um arraste adequado deste composto do mosto para o destilado.

CONCLUSÕES

6- Conclusões

De acordo com os resultados observados, podemos concluir que a metodologia proposta por Vicente *et al.* (2005) para isolamento, identificação e caracterização de cepas *Saccharomyces cerevisiae* é adequada para a seleção de cepas de leveduras com características apropriadas para serem introduzidas na fermentação de cana-de-açúcar para permitir a produção de uma cachaça de melhor qualidade.

Neste trabalho, propomos que apenas a utilização de metodologias baseadas no polimorfismo do DNA não são suficientes para avaliar a diversidade genética de cepas *Saccharomyces cerevisiae* em processos fermentativos espontâneos, portanto, sugerimos que o uso de cepas selecionadas como fermento iniciador requer o uso combinado de métodos bioquímicos e moleculares que possibilitem caracterizar e analisar a dinâmica das cepas selecionadas durante todo o processo fermentativo.

O trabalho demonstrou também que mais estudos sobre a atividade de enzimas como álcool acetiltransferases, álcool aciltransferases e esterases são necessários para melhor entendimento de como e quais fatores afetam a atividade destas enzimas, para permitir a produção adequada de teores mais elevados de compostos que conferem sabor e aroma na utilização de cepas selecionadas na fermentação da cachaça de alambique.

PERSPECTIVAS

7- Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a necessidade de mais estudos sobre a seleção de cepas de leveduras a serem utilizadas como fermento iniciador no processo fermentativo da cachaça. Deste modo, sugerimos as seguintes etapas futuras de estudo:

- Dosagem das atividades da álcool aciltransferase e esterase para verificar a atividade dessas enzimas e sua correlação com a produção de ésteres de interesse;
- Avaliar a atividade da enzima álcool acetiltransferase e verificar a sua correlação com a produção de acetato de isoamila e acetato de etila, observando quais são os fatores que afetam a atividade desta enzima;
- Estudar novas técnicas moleculares, como por exemplo: microsatélite, análise da seqüência interdelta e análise de restrição do DNAm, para acompanhamento adequado das cepas selecionadas utilizadas durante a produção de cachaça;
- Realizar novos estudos com um número maior de cepas e correlacionar diversidade genética com distribuição geográfica;
- Avaliar a estabilidade genética das cepas de leveduras selecionadas em relação aos critérios utilizados na seleção;
- Realizar fermentações em uma destilaria utilizando as quatro cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* para verificar se os critérios que utilizamos na seleção são realmente adequados para a produção de cachaça de alambique, visando ainda conhecer o tempo de permanência das cepas no processo e o perfil químico da cachaça produzida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8- Referências bibliográficas

AKADA, R., MATSUO, K., ARITOMI, K., NISHIZAWA, Y. (1999). Construction of recombinant sake yeast containing a dominant FAS2 mutation without extraneous sequences by a two-step gene replacement protocol. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87(1)**, 43-48.

AKADA, R., HIROSAWA, I., HOSHIDA, H., NISHIZAWA, Y. (2001). Detection of a point mutation in FAS2 gene of sake yeast strains by allele-specific PCR amplification. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92(2)**, 189-192.

ALVAREZ, P., MALCORPS, P., ALMEIDA, A., FERREIRA, A. MEYER, A. M., DUFOUR, J. P. (2004). Analysis of free fatty acids, fusel alcohols and esters in beer: an alternative to CS₂ extraction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52**, 127-134.

ANDRICETTO, C., PSOMAS, E., TZANETAKIS, N., SUZZI, G., LOMBARDI, A. (2000). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 5-9.

ANGELIS, D. F. (1992). Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam a fermentação etanólica. In: Mutton, M. J. R., Mutton, M. A. (1992). *Aguardente de cana: produção e qualidade*. Jaboticabal: UNESP-FCAV, 49-65.

ARIKAWA, Y., YAMADA, M., SHIMOSAKA, M., OKAZAKI, M., FUKUZAWA, M. (2000). Isolation of sake yeast mutants producing a high level of ethyl caproate and/or isoamyl acetate. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **90(6)**, 675-677.

ASANO, T., INOUE, T., KUROSE, N., HIRAOKA, N., KAWAKITA, S. (1999). Improvement of isoamyl acetate productivity in sake yeast by isolating mutants resistant to econazole. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87(5)**, 697-699.

ASANO, T., KAWADU, M., KUROSE, N., TARUMI, S., KAWAKITA, S. (2000). Effect of the FAA1 gene disruption of sake yeast on the accumulation of ethyl caproate in sake mash. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **89(6)**, 609-611.

ASHIDA, S., ICHIKAWA, E., SUGINAMI, K., IMAYASU, S. (1987). Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate a sake component. *Agric. Biol. Chem.* **51(8)**, 2061-2065.

BARNETT, J. A., PAYNE, R. W., YARROW, D. (1990). *Yeast, characteristic and identification*. Cambridge: Cambridge Univ. Press., 810p

BARROS LOPES, M., SODEN, A., HEBSCHKE, P. A., LANGRIDGE, P. (1996). PCR differentiation of commercial yeast strains using intron *splice site primers*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(12)**, 4514-4520.

BARROS LOPES, M., SODEN, A., MARTENS, A. L., HENSCHKE, P. A., LANGRIDGE, P. (1998). Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 279-286.

BOSCOLO, M., BEZERRA, C. W. B., CARDOSO, D. R., NETO, B. S. L., FRANCO, D. W. (2000). Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in brazilian sugar-cane spirit. *Chem. Soc.* **11(1)**, 86-90.

- CANSADO, J., LONGO, E., CALO, P., SIERO, C., VELAZQUES, J. B., VILLA, T. G. (1991). Role of a killer character in spontaneous fermentation from NW Spain: ecology, distribution and significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 643-647.
- CARDELLO, H. M. A. B., FARIA, J. B. (1998). Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus Alba L.*) *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **18(2)**, 169-175.
- CARDOSO, M. G. (2001). Produção de aguardente de cana-de-açúcar . Lavras: UFLA, p 264.
- CASALONE, E., FIA, G., BARBERIO, C., CAVALIERI, D., TURBANTI, L., POLSINELLI, M. (1997). Genetic and biochemical of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to trifluoroleucine. *Res. Microbiol.* **148**, 613-623.
- CAPPELLO, M. S., BLEVE, G., GRIECO, F., DELLAGLIO, F., ZACHEO, G. (2004) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiol.* **10**, 1-7.
- CAVALIERI, D., CASALONE, E., BENDONI, B., FIA, G., POLSINELLI, M., BARBEIRO, C. (1999). Trifluoroleucine resistance and regulation of α -isopropylmalate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 152-160.
- CELENZA, J. L., CARLSON, M. (1989). Multational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5045-5054.

COCOLIN, L., PEPE, V., COMITINI, F., COMI, G., CIANI, M. (2004). Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research* **5**, 237-245.

COMI, G., MAIFRENI, M., MANZANO, M., LAGAZIO, C., COCOLIN, L. (2000). Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy). *Inter. Journal of Food Microb.* **58**, 117-121

CÔRREA, S. R. (1999). Microhabitats ocupados por *Saccharomyces cerevisiae* durante os períodos de entressafra e produção em três destilarias de aguardente artesanal. p74. Tese (Dissertação de Mestrado). Depto. de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

DEFELIPO, B. V., RIBEIRO, A. C. (1981). Análise química do solo; metodologia. Viçosa: UFV. 35-42.

D'HAUTCOUT, O., SMART, K. A. (1999). Measurement of brewing yeast flocculation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **57(4)**, 123-128.

ESTEVE-ZARZOSO, B., GOSTÍN CAR, A., BORET, R., URUBURU, F., QUEROL, A. (2000) Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedes' area (Spain). *Food Microbiol.* **17**, 553-562.

EMBRAPA (1999). Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes, 18-123.

FALQUE, E., FERNANDEZ, E., DUBOURDIEU, D. (2001). Differentiation of White wines by their aromatic index. *Talanta* **54**, 271-281.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T., LÓPEZ, V., RAMÓN, D., BARTRA, E., QUEROL, A., (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Inter. Journal of Food Microbiol.* **70**, 1-10.

EKUNSANMI, T. J., ODUNFA, S. A. (1990). Ethanol tolerance, sugar tolerance and invertase activities of same yeast strains isolated from steep water of fermenting cassava tubers. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 672-675.

FINN, D. A., STEWART, G. G. (2002). Fermentation characteristics of dried brewers yeast; Effect of drying on flocculation and fermentation. *J. Am. Soc. Chem.* **60(3)**, 135-139.

FLEET, G. H., GILLIAN, M. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 727-728.

FLEET, G. H., HEARD, M. H. (1993). Yeasts: growth during fermentation. In: FLEET, G. H. Wine Microbiol. Biotechnol. *Harwood Academic Publ.*

FRAILE, P., GARRIDO, J., ANCIN, C. (2000). Influence of a *Saccharomyces cerevisiae* selected strain in the volatile composition of rose wines. Evolution during fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1789-1798.

FUJII, T., NAGASAWA, N., IWAMATSU, A., BOGAKI, T., TAMAI, Y., HAMACHI, M. (1994). Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Applied and Environm. Microbiol.* **60(8)**, 2786-2792.

FUJII, T., KOBAYASHI, O., YOSHIMOTO, H., FURUKAWA, S., TAMAI, Y. (1997). Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Applied and Envir. Microb.* **63(3)**, 910-915.

FUKUDA, K., YAMAMOTO, N., KIYOKAWA, Y., YANAGIUCHI, T., WAKAI, Y., KITAMOTO, K., INQUE, Y., KIMURA, A. (1998). Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Applied and Environmental Microbiology* **64(10)**, 4076-4078.

GANCEDO, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 334-361.

GRAVATÁ, C. E. (1999). Manual da cachaça artesanal. 4 ed. Belo Horizonte: UMA p 104.

GOLDSTEIN, A., LAMEN, J. O. (1975). β -D-fructofuranoside fructo-hidrolase from yeast. *Methods enzymol.* **42**, 504-511.

GOMES, F. C. O. (2002). Estudo de duas linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* como iniciadoras da fermentação para a produção da cachaça artesanal. 85p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

GUERRA, J. B., ARAÚJO, R. C. A., PATARO, C., FRANCO, G. R., MOREIRA, E. S.A., MENDONÇA-HAGLER, L. C., ROSA, C. R. (2001). Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Letters in Applied Microbiology*. **33**, 106-111.

HEARD, G., FLEET, G. H. (1987). Occurrence and growth of killer yeast during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2171-2174.

HERNANDEZ-ORTE, P., CACHO, J. F., FERREIRA, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2891-2899.

HERAS-VASQUEZ, F. J. L., MINGORANCE-CAZORLA, L., CLEMENTE-JIMENEZ, J. M., RODRIGUEZ-VICO, F. (2002). Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research* **15**(3), 1-7.

HUFFMAN, J. L., MOLINA, F. I., JONG, S. (1992). Authentication of ATCC strains in the *Saccharomyces cerevisiae* complex by PCR fingerprinting. *Experimental Mycology* **16**, 316-319.

ICHIKAWA, E., HOSOKAWA, N., HATA, Y., ABE, Y., SUGINAMI, K., IMAYASU, S. (1991). Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agri. Biol. Chem.* **55**(8), 2153-2154.

IRANZO, J. F. U., PEREZ A. L., CANAS, P. M. I. (1998). Study of the enological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. *Food Microbiology* **15**, 399-406.

JIBIKI, M., ISHIBIKI, T., YUUKI, T., KAGAMI, N. (2001). Application of polymerase chain reaction to determine the flocculation properties of brewer's lager yeast. *J. Am. Brew. Chem.* **59**(3) 107-110.

JIN, Y., SPEERS, R. A. (1998). Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International* **31**(6-7), 421-440.

JIN, Y., SPEERS, R. A. (2000). Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **58**(3), 108-116.

JIN, Y., RITCEY, L. L., SPEERS, R. A., DOLPHIN, P. J. (2001). Effect of cell surface hydrobicity, charge, and zimolectin density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **59**(1), 1-9.

JIRANEK, V., LANGRIDGE, P., HENSCHKE, P. A. (1995). Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast under enological conditions. *American Journal of Enology and Viticulture* **46(2)**, 269-273.

KAJIWARA, Y., OGAWA, K., TAKASHITA, H., OMORI, T., SHIMODA, M., WADA, H. (1997). Intracellular fatty acid formation and alcohol acetyl transferase gene expression in brewing yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) treated with heat shock. *Journal of Ferment. and Bioeng.* **84(6)**, 594-598.

LACHANCE, M. A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* **68**, 151-160.

LAMBRECHTS, M. G., PRETORIUS, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma – A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97-129.

LEGRAS, J. L., KARST, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiology Letters* **221**, 249-255.

LILLY, M., LAMBRECHTS, M. G., PRETORIUS, I. S. (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Applied and Environmental Microbiology* **66(2)**, 744-753.

LONGO, E., VELÁZQUEZ, J. B., SIEIRO, C., CANSADO, J., CALO, P., VILLA, T. G. (1992). Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, N. W. Spain). *Word J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 539-541.

LÓPEZ, V., QUEROL, A., RAMÓN, D., FERNANDEZ-ESPINAR, M. T. (2001). A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology* **68**, 75-81.

LÓPEZ, V., FERNANDEZ-ESPINAR, M. T., BARRIO E., RAMÓN D., QUEROL A., (2003). A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* **81**, 63-71.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGHT, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

LYNESS, C. A., STEELE, G. M., STEWART, G. (1997). Investigating ester metabolism: characterization of the ATF1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **55(4)**, 141-146.

MAIA, A. B. R. A., PEREIRA, A. J., SCHWABE, W. K. (1994). 2º Curso de Tecnologia para Produção de Aguardente de Qualidade. Fundação Christiano Ottoni. 74p.

MARIANGELI. P., ANGELOZZI. D., CIANI. M., CLEMENTI. F., MANNZZU. I. (2003). Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterization. *FEMS Yeast Research* **1664**, 1-9.

MARTINEZ, F., TOLEDANO, F., MILLÁN, C., ORTEGA, J. M. (1990). Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from 'Pedro Ximenez' grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food Microbiol.* **7**, 217-225.

MASON, A. B., DUFOR, J. (2000). Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* **16**, 1278-1298.

- MITTERDORFER, G., MAYER, H. K., KNEIFEL, W., VIERNSTEIN, H., (2002). Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. *Journal Appl. Microbiology*. **93**, 521-530.
- MORAIS, P. B., ROSA, C. A., LINARDI, V. R., PATARO, C., MAIA, A B. R. A. (1997). Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. *World Journal of Microbiology* **13**, 241-243.
- NONATO, E. A., CARAZZA, F., SILVA, F. S.; CARVALHO, C. R., CARDEAL, Z. L. (2001). A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian sugar cane spirits by gas chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* **49**, 3533-3539.
- OLIVEIRA, S. G., MAGALHÃES, M. A. (2002). Procedimento para produção da cachaça artesanal de Minas regulamentada pelo decreto nº 42.644 de 05/06/2002. *Informe Agropecuário* **23(217)**, 78-83.
- OLIVEIRA, E. S., ROSA, C. A., MORGANO, M. A., SERRA, G. E. (2004). Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **20**, 19-24.
- OSTERGAARD, S., OLSSON, L., NIELSEN, J. (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64(1)**, 34-50.
- PATARO, C., SANTOS, A. CORREA, S. R. MORAIS, P. B., LINARDI, V. R. ROSA, C. R. (1998). Physiological characterization of yeast isolated from artisanal fermentation in na aguardente distillery. *Revista de Microbiologia* **29**, 104-108.

PATARO, C., GUERRA, J. B., PETRILLO-PEIXOTO, M. L., MENDONÇA-HAGLER, L. C., LINARDI, V. R., ROSA, C. A. (2000). Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 1-9.

PATARO, C., GOMES, C. O., ARAÚJO, R. A. C., ROSA, C. A., SCHWAN, R. F., CAMPOS, C. R., CLARET, A. S., CASTRO, H. A. (2002). Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte **23(217)**, 37-43.

PATEL, S., SHIBAMOTO, T. (2002). Effect of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on production of volatiles in Napa Gamay Wine and Petite Sirah Wine. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5649-5653.

PEREZ, M. A., GALLEGRO, F. J., HIDALGO, P. (2001). Evolution of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiology Letters* **205**, 375-378.

PLATA, M. D. C., MAURICIO, J. C., MILLÁN, C., ORTEGA, J. M. (1998). *In vitro* specific activity of alcohol acetyltransferase and esterase in two flor yeast strains during aging of sherry wines. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **85(4)**, 369-374.

PLENGVIDHYA, V., BREIDT, JR., FLEMING, H. P. (2004). Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *Intern. Journal of Microbiol.* **81**, 115-125.

POWELL, C. D., QUAIN, D. E., SMART, K. A. (2003). The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *Fems Yeast Research* **3**, 149-157.

PRAMATEFTAKI, P. V., LANARIDIS, P., TYPAS, M. A. (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Journal of Applied Microbiology*. **89**, 236-248.

PRETORIUS, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 675-729.

QUEROL, A., BARRIO, E., RAMÓN, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *System. Appl. Microbiol* **15**, 439-446 a.

QUEROL, A., BARRIO, E., HUERTA, T., RAMÓN, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentation conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiology*. **58**, 2948-2953 b.

QUEROL, A., RAMÓN, D. (1996). The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Tech.* **7**, 73-78.

REDZEPOVIC, S., ORLIC, S., SIKORA, S., MAJDAK, A., PRETORIUS, I. S. (2002). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Letters in Appl. Microb.* **35**, 305-310.

RIBEIRO, J. C. G. M. (1997). Fabricação artesanal da Cachaça Mineira. Belo Horizonte: Ed. Perform, 162p.

RIBEIRO, C. A. F., HORII, J. (1999). Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação do caldo de cana. *Scj. Agric.* **56(2)**, 255-263.

ROJAS, V., GIL, J. V., MANZANARES, P., GAVARA, R., PIÑAGA, F., FLORS, A. (2002). Measurement of alcohol acetyltransferase and ester hydrolase activities in yeast extracts. *Enzyme and Microbial Technology* **30**, 224-230.

ROMANO, P., SUZZI, G., TURBANTI, L., POLSINELLI, M. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**, 213-218.

ROMANO, P., PARAGGIO, M., TURBANTI, L. (1998). Stability in by-product formation as a selection tool of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 336-341.

ROMANO, P., FIORE, C., PARAGGIO, M., CARUSO, M., CAPECE, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Intern. Journal of Microbiol.* **86**, 169-180.

SABATE, J. CANO, J., QUEROL, A., GUILLAMÓN, J. M. (1998). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 452-455.

SALGADO, A. P. C., SCHULLER, D., CASAL, M., LEÃO, C., LEIPER, F. C., CARLING, D., FIETTO, L. G., TRÓPIA, M., J., CASTRO, I. M., BRANDÃO, R. L. (2002). Relationship between protein kinase C and derepression of different enzymes. *FEBS Letters* **532**, 324-332.

SANNI, A. I., LONNER, C. (1993). Identification of yeast isolated Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology* **10**, 517-523.

SATYANARAYANA, T., UMBARGER, H. E., LINDEGREN, G. (1968). Biosynthesis of branched-chain amino acids in yeast: regulation of leucine biosynthesis in prototropic and leucine auxotrophic strains. *Journal of Bacteriology* **96(6)**, 2018-2024.

SCHÜLLER, D., VALERO, E., DEQUIN, S., CASAL, M. (2004). Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters*. **231**, 19-26 a.

SCHÜLLER, D., ALVES, H., DEQUIN, S., CASAL, M. (2004) Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*. **233**, 31-41 b.

SCHUTZ, M., GAFNER, J. (1993). Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 551-558.

SCHUTZ, M., GAFNER, J. (1994). Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Lett. Microbiol.*, **19**, 253-257.

SCHWAN, R. F., MENDONÇA, A. T., SILVA JÚNIOR, J. J., RODRIGUES, V., WHEALS, A. E. (2001). Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*. **79**, 89-96.

SEBRAE, (2002). Plano de reestruturação da cadeia da cachaça de alambique de Minas Gerais. P 56.

SEFA-DEDEH, S., SANI, A. I., TETTEH, G. SAKYI-DAWSON, E. (1999). Yeast in the traditional brewing of pito in Ghana. *Word J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 593-597.

SLUIS, C. V. D., RAHARDJO, Y. S. P., SMIT, B. A., KROON, P. J., HARTMANS, S., SCHURE, E. G. T., TRAMPER, J., WIJFFELS, R. H. (2002). Concomitant extracellular accumulation of alpha-keto acids and higher alcohols by *Zigosaccharomyces rouxii*, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **93** (2), 117-124.

THORNTON, R. J. (1991). Wine yeast research in New Zealand and Australia. *Crit. Rev. Biotechnol.* **11**, 327-345.

TORRIANI, S., ZAPPAROLI, G., SUZZI, G. (1999). Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces cerevisiae sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwehoek* **75**, 207-215.

TRACY, J. W., KOHLHAW, G. B. (1977). Evidence for two distinct CoA binding sites on yeast α -isopropylmalate synthase. *The Journal of Biol. Chemistry* **252**(12), 4085-4091.

ULM, E. H., BOHME, R., KOHLHAW, G. (1972). α -Isopropylmalate syntase from yeast: purification, kinetic studies, and effect of ligands on stability. *Journal of Bacteriology* **110**(3), 1118-1126.

VALENTE, P., GOUVEIA, F. C., DE LEMOS, G. A., PIMENTEL, D., VAN ELSAS, J. D., MENDONCA-HAGLER, L. C. AND HAGLER, A. N. (1996). PCR amplification of the r-DNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **137**(2-3), 253-6.

VAN VUUREN, H. J. J., JACOBS, C. J. (1992). Killer yeast in the wine industry: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 119-128.

VAUGHAN-MARTINI, A., MARTINI, A. (1998). *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In the yeast, a taxonomic study, 4th edn. Ed. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. 358-372.

VAUGHAN-MARTINI, A., MARTINI, A. (1983). A taxonomic key the genus *Saccharomyces*. *System. Appl. Microbiol.* **16**, 113-119.

VAUGHAN-MARTINI, A., MARTINI, A. (1987). Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoech* **53**, 77-84.

VERSAVAUD, A., COURCOUX, P., ROULLAND, C., DULAU, L., HALLET, J. N. (1995). Genetic diversity and geographical distribution of wild *S. cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Envir. Microb.* **61**, 3521-3529.

VERSTREPEN, K. J., DERDELINCKX, G., DELVAUX, F. R., WINDERICKX, J., THEVELEIN, J. M., BAUER, F. F., PRETORIOS, I. S. (2001). Late fermentation expression of *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Sac. Brew. Chem.* **59(2)**, 69-76.

VESTREPEN, K. J., VAN LAERE, S. D. M., VANDERHAEGEN, B. N. P., DERDELINCKX, G., DUFOUR, J., PRETORIUS I. S., WINDERICKC. J., THEVELEIN, J. M. (2003). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Ig-ATF1. and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69(9)**, 5228-5237 a.

VERSTREPEN, K. J., DERDELINCKX, G., DUFOUR, J., WINDERICKC. J., PRETORIUS I. S., THEVELEIN, J. M., DELVAUX, F. R., (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase gene ATF1 is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. *FEMS Yeast Research* **1598**, 1-12 b.

VERSTREPEN, K. J., DERDELINCKX, G., VERACHTERT, H., DELVAUX, F. R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbil. Biotechnol.* **61**, 197-205 c.

VEZINHET, F., HALLET, J. N., VALADE, M. POULARD, A. (1992). Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 83-86.

VIANNA, E., EBERLER, S. E. (2001). Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gás chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 589-595.

VICENTE, M. A., FIETTO, L. G., CASTRO, I. M., SANTOS, A. N. G., COUTRIN, M. X., BRANDÃO, R. L. (2005). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. *Inter. Journal of Food Microbiol.* No prelo.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetic. In: PCR protocols: A guide to methods and applications (Inns, M. A., Gelfrand, D. H., Sninsky, J. J., With, T. J. Eds) p. 315-322. Academic Press, New York.

YOSHIKAWA, S. OGURI, I., KONDO, K., FUKUZAWA, M., SHIMOSAKA, M., OKAZAKI, M. (1995). Enhanced formation of isoamyl alcohol in *Zygosaccharomyces rouxii* due to elimination of feedback inhibition of α -isopropylmalate syntase. *FEMS Microbiology Letters* **127**, 139-143.

YOSHIZAWA, K. (1999). Sake: Production and Flavor. *Food. Rev. Int* **15(1)**, 83-107.

ZEA, L. MORENO, J., MEDINA, M. ORTEGA, J. M. (1994). Evolution of C6, C8, e C10 acids and their ethyl esters in cells and musts during fermentation with three *Saccharomyces cerevisiae* races. *J. Ind. Microbiol.* **13**, 269-272.

ZIRONI, R., ROMANO, P., SUZZI, G., BATTISTUTTA, F., COMI, G. (1993). Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guillermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **15**, 235-238.

ANEXO

9- ANEXO

9.1- Análise de Zn

As amostras de solo, caldo de cana e cachaça foram fornecidas por produtores do Estado de Minas Gerais de três regiões distintas, de acordo com o mapa do setor produtivo de cachaça do Estado de Minas Gerais (Oliveira e Magalhães, 2002). Entre as amostras analisadas haviam respectivamente duas amostras do Sul / Sudeste de Minas, duas do Norte de Minas / Jequitinhonha e duas do Triângulo Mineiro, as quais correspondiam respectivamente as cidades de Lavras, Perdões, Salinas, Jequitinhonha, Araxá e Perdizes.

A cachaça produzida no Norte de Minas em especial, é famosa por seu sabor e aroma característicos. Muitos produtores acreditam que o diferencial destas cachaças em relação à produção de álcoois e ésteres seja devido ao Zn presente no solo. Sem o devido conhecimento sobre o assunto, muitos produtores têm realizado adubações foliares em seus canaviais, esperando produzir uma cachaça de boa qualidade com elevados teores de álcoois e ésteres.

O Zinco é um mineral que pode ser encontrado no solo e ser absorvido pelas plantas quando disponível (Defelipo e Ribeiro, 1981). Na síntese de álcool isoamílico, é observado que o Zn participa da inativação da enzima α -IPM quando complexado a CoA (Tracy e Kohlhaw, 1977; Cavalieri *et al.*, 1999). A α -IPM sintase é a enzima responsável pelo controle da via sintética do álcool isoamílico (Satyanarayana *et al.*, 1968).

No presente trabalho foi analisado o teor de Zn^{2+} no solo e caldo de cana de várias destilarias do estado de Minas Gerais, para confirmar a hipótese de que, na presença de Zn^{2+} as cepas de leveduras poderiam eventualmente apresentar a enzima α -IPM mais resistente a este tipo de inibição, produzindo uma grande quantidade de álcool isoamílico. As amostras de cachaça foram também analisadas e o teor de álcool isoamílico quantificado. Em nossos resultados foi observado que entre as amostras analisadas, independente da região do Estado, não houve correlação entre um alto teor de álcool isoamílico e os teores de Zn^{2+} no solo e no caldo de cana.

Como podemos observar na Figura 14, houve uma pequena correlação entre o teor de Zn^{2+} das amostras de solo e caldo de cana. Em nossos resultados observamos ainda que algumas amostras apresentaram elevado teor de álcool isoamílico, porém, sem nenhuma relação com a quantidade de Zn^{2+} presente no solo ou no caldo de cana, contudo a amostra de cachaça analisada corresponde à produção de dois anos antes da coleta das amostras de solo e cana, não podendo deste modo comprovar que a adubação foliar deste mineral não está relacionada aos teores de álcool isoamílico na cachaça.

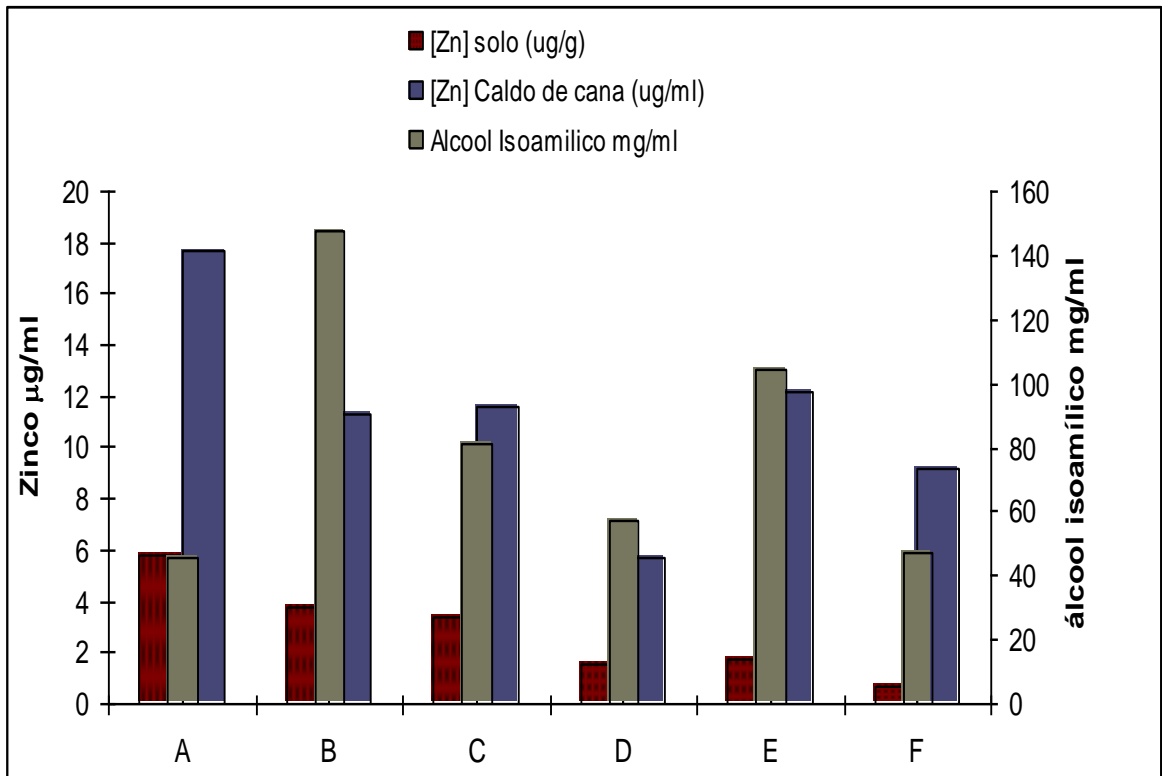


Figura 14: Análise do teor de Zn no solo e no caldo de cana e teor de álcool isoamílico nas amostras de cachaça de acordo com as destilarias que forneceram as amostras. As amostras A e D representam o Sul / Sudeste de Minas, B e C o Norte de Minas / Jequitinhonha e E e F o Triângulo Mineiro, respectivamente.